

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Irena Parohová

Paraziti a roztroušená skleróza: spouštěči onemocnění, nebo nástroj terapie?

Parasites and multiple sclerosis: trigger or treatment?

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Tomáš Macháček

Praha, 2018

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Mgr. Tomáši Macháčkovi za nezměrnou trpělivost a důvěru v průběhu vypracovávání mé bakalářské práce, spolu s cennými radami udělenými během konzultací.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16.8. 2018

Podpis

Abstrakt

Roztroušená skleróza (RS) je zánětlivé autoimunitní onemocnění, jehož nárůst je recentně pozorován hlavně ve vyspělých zemích. Její dosud neobjasněný původ přispívá k obtížnosti terapie. V etiologii roztroušené sklerózy byl studován i vliv parazitů, u lidí však nebyl spolehlivě prokázán. Data ze zvířecích modelů RS naopak naznačují spíše protektivní efekt infekce parazitickými helminty na průběh onemocnění. Helminti v hostiteli indukují různorodé imunoregulační mechanismy, které tlumí zánět probíhající v centrální nervové soustavě. Tyto poznatky byly v rámci tzv. helmintické terapie (založené především na aplikaci vajíček tenkohlavce *Trichuris suis*) ověřovány i u lidských pacientů s RS. Dosavadní výsledky naznačují protektivní efekt aplikace *T. suis* RS pacientům, avšak tyto klinické studie byly provedené na malém počtu probandů. Kromě toho se v některých případech vyskytly patologické projevy související s infekcí. Řešením by byla identifikace konkrétních parazitárních molekul s imunomodulačním potenciálem.

Klíčová slova: roztroušená skleróza, experimentální autoimunitní encefalomyelitida, hygienická hypotéza, helmintická terapie, mechanismy imunomodulace

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory autoimmune disease and its growth has been recently recorded mostly in developed countries. Its yet unsolved origin contributes to difficulties with therapy of this disease. The influence of parasites in aetiology of MS has also been investigated, although never reliably proven in human trials. On the contrary, data from animal models of MS suggest a rather protective effect towards the disease progression, acquired through parasitic helminth infection. In the host helminths induce a variety of immunoregulatory mechanisms, which alleviate the ongoing inflammation in the central nervous system. These observations within the so-called helminthic therapy (mostly based on the application of whipworm *Trichuris suis* eggs) have been tested in human patients also. Up to date, results indicate a protective effect of application of *T. suis* to MS patients, however these clinical studies were executed only on a small number of probands. Besides this, pathological manifestations related to the infection of parasite occurred in some cases. A solution could be the identification of specific parasite derived molecules with immunomodulatory potential.

Key words: multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, hygiene hypothesis, helminthic therapy, mechanisms of immunomodulation

Seznam zkratk

AAM	alternativně aktivované makrofágy
ALCAM	adhezivní molekula aktivovaného T lymfocyty, z angl. activated leucocyte adhesion cell molecule
APC	antigen prezentující buňky
Breg	regulační B lymfocyty
CD	diferenciační skupina, z angl. cluster of differentiation
CIS	klinicky izolovaný syndrom
CNS	centrální nervová soustava
CSF	mozkomíšní mok
DC	dendritické buňky
dpi	dni po infekci
EAE	experimentální autoimunitní encefalomyelitida
EBNA-1	Epstein-Barr nukleární antigen-1
EBV	Epstein-Barr virus
ES	exkrečně-sekreční
Foxp3	forkhead box protein 3
FhHDM-1	imunomodulační peptid produkovaný <i>Fasciola hepatica</i>
Gal-9	galektin 9
HEB	hematoencefalická bariéra
HHV6	lidský herpesvirus 6
HINT	helmintem indukovaná imunomodulační terapie, z angl. helminth-induced immunomodulation therapy
HLA	lidský leukocytární antigen, z angl. human leucocyte antigen
ICAM-1	mezibuněčná adhezivní molekula, z angl. intercellular adhesion molecule 1
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IL-R	interleukinový receptor
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
LCMV	virus lymfocytické choriomeningitidy
LNFP III	lakto-N-fukopentóza III

MBP	základní myelinový protein, z angl. myelin basic protein
MDSC	myeloidní supresorová buňka
MHV	virus myši hepatitidy
MOG	myelin oligopeptid protein
MRI	magnetická rezonance
NGF	nervový růstový faktor, z angl. nerve growth factor
NK	přírození zabíječi, z angl. natural killer
NO	oxid dusnatý
NOD	neobézní diabetický, z angl. non obese diabetic
PD-L	ligand programované smrti
PLP	proteolipid protein
PMBC	periferní krevní monocyty
PPRS	primárně progresivní roztroušená skleróza
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
RRRS	relaps-remitentní roztroušená skleróza
RS	roztroušená skleróza
SEA	rozpuštěné antigeny vajíčka, z angl. soluble egg antigens
SP	rozpuštěné produkty, z angl. soluble products
SPRS	sekundárně progresivní roztroušená skleróza
STAT6	převaděč signálu a aktivátor transkripce 6
TCR	receptor T lymfocytů, z angl. T cell receptor
TGF	transformující růstový faktor, z angl. transforming growth factor
Tim-3	imunoglobulinová a mucinová doména 3 T lymfocytu, z angl. T cell immunoglobulin and mucin domain 3
Th	pomocné T lymfocyty
TMEV	Theilerův virus myši encefalitidy
TNF	tumor nekrotizující faktor, z angl. tumor necrosis factor
Treg	regulační T lymfocyty
TRIMS	terapie vajíčky <i>Trichuris suis</i> pro relapsivní roztroušenou sklerózu, z angl. <i>Trichuris suis</i> ova therapy for relapsing multiple sclerosis
TRIOMS	vajíčka <i>Trichuris suis</i> u relaps-remitentní roztroušené sklerózy a klinicky izolovaného syndromu, z angl. <i>Trichuris suis</i> ova in recurrent remittent multiple sclerosis and clinically isolated syndrome

Tr1	subpopulace regulačních T lymfocytů 1
TSO	vajíčka <i>Trichuris suis</i>
VCAM-1	cévní adhezivní molekula 1, z angl. vascular adhesion cell molecule 1
WIRMS	červi pro imunitní regulaci RS, z angl. worms for immune regulation of MS

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Roztroušená skleróza.....	2
2.1. Patogeneze a typy RS	2
2.2. Příčiny onemocnění	4
2.2.1. Neinfekční faktory.....	4
2.2.2. Infekční faktory	5
2.3. Zvířecí modely RS.....	5
2.3.1. Experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE)- základní zvířecí model RS.....	6
2.3.2. Virem indukované zvířecí modely demyelinizace	7
2.3.3. Toxické modely demyelinizace a remyelinizace.....	7
3. Úloha parazitů v etiologii RS	8
3.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	8
3.2. <i>Acanthamoeba castellanii</i>	9
3.3. <i>Plasmodium falciparum</i>	10
4. Vliv parazitů na průběh RS u zvířecích modelů.....	11
4.1. Helminti s pozitivním vlivem na průběh EAE	11
4.1.1. <i>Heligmosomoides polygyrus</i>	11
4.1.2. <i>Trichinella spp.</i>	13
4.1.3. <i>Taenia crassiceps</i>	14
4.1.4. <i>Schistosoma spp.</i>	16
4.1.5. <i>Fasciola hepatica</i>	17
4.2. Helminti s negativním vlivem na průběh EAE.....	18
4.2.1. <i>Toxascaris leonina</i>	18
4.3. Protista s pozitivním vlivem na průběh EAE	19
4.3.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
4.3.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	19
4.4. Protista s negativním vlivem na průběh EAE.....	20
5. Využití parazitů a jejich produktů v terapii RS.....	20
5.1. Hygienická hypotéza a hypotéza „starých přátel“	20
5.2. Terapie RS helminty u lidí	20
5.2.1. Přirozená infekce helminty u RS	21
5.2.2. Klinické testy terapie RS helminty	22
5.2.3. Produkty helmintů využité v terapii RS	25
6. Závěr	26
Seznam použité literatury:.....	28

1. Úvod

Roztroušená skleróza (RS) je autoimunitní onemocnění centrální nervové soustavy, v níž dochází k postupné demyelinizaci a ztrátě axonů. RS se řadí mezi nejčastější neurologická onemocnění a počty nemocných v posledních letech rostou. Její prevalence ve světě je odhadována na více než 2,3 milionu lidí (Browne et al., 2014). Klinický obraz RS je velmi různorodý, přičemž první příznaky se mohou projevit již mezi 20. a 30. rokem života. Symptomy se různí, přesto je však dopad této nemoci na pacienty drtivý a dochází k výraznému snížení kvality života nemocného.

Přesný původ onemocnění však stále zůstává záhadou. RS je vysoce pravděpodobně způsobena hned několika faktory a jedním z nich může být i infekce. Mimo možné role parazitů jako původců RS je daleko studovanější a pravděpodobnější jejich úloha jako terapeutického nástroje. Současná klasická léčba pomocí imunosupresiv slouží pouze k potlačení symptomů a nevede k eliminaci nemoci, může mít navíc nežádoucí účinky. Proto je nutné hledat a ověřovat další možnosti terapeutických zásahů, které by zastavily či zpomalily průběh onemocnění a eliminovaly jeho projevy.

K tomu by nám mohli dopomoci právě paraziti, organismy, které s námi podstoupily dlouhou koevoluci. Během tohoto společného vývoje si paraziti vyvinuli mechanismy imunomodulace, pro co nejefektivnější získávání zdrojů spolu s minimem vedlejších negativních účinků na hostitele. Výsledky některých epidemiologických studií ukazují na nenáhodnou korelaci mezi výskytem RS a některých parazitárních infekcí, v kontextu snížené prevalence RS a zvýšeného počtu infekcí těchto parazitů (Fleming & Cook, 2006).

Tato práce si proto klade za cíl s využitím poznatků ze zvířecích modelů i klinických studií s lidskými probandy prozkoumat roli parazitů (protist a helmintů) v etiologii RS a možnosti jejich využití v terapii RS.

2. Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (RS) je chronické degenerativní autoimunitní onemocnění postihující centrální nervovou soustavu (CNS). Zapříčiňuje demyelinizaci axonů za vzniku mnohočetných rekurentních zánětlivých ložisek v bílé hmotě v mozku a míše. Klinický průběh onemocnění je typicky nepředvídatelný, může nabýt maligní nebo benigní podoby. Symptomy jsou nespecifické a jejich projev se mezi pacienty různí. Mezi časté projevy patří necitlivost končetin, zhoršení či ztráta zraku, poruchy chůze a rovnováhy. V pozdější fázi onemocnění dochází ke kognitivním dysfunkcím, psychickým problémům, slabosti, únavě, a řadě dalších (Confavreux, Vukusic, and Adeleine 2003).

2.1. Patogeneze a typy RS

Díky doposud neznámému hlavnímu negenetickému faktoru způsobujícímu RS je rozpoznávání mechanismů patogeneze obtížnější. Není stále jasné, zda se počátek nemoci nalézá v periferní nervové soustavě či přímo v CNS (Dendrou, Fugger, & Friese, 2015). Pokud tomu tak je v perifériích, dochází zde k aktivaci autoreaktivních T lymfocytů. K tomu může docházet hned ze dvou důvodů. Nedostatečná kontrola regulačních T lymfocytů (Treg) či větší odolnost autoreaktivních T lymfocytů mohou být příčinou aktivace těchto autoreaktivních buněk. K aktivaci těchto buněk dochází pravděpodobně skrze molekulární mimikry, bystander aktivaci, koexpresi receptorů T lymfocytů (TCR) či vystavení se novému autoantigenu (Ji, Perchellet, & Goverman, 2010). Tyto autoreaktivní T lymfocyty obvykle rozpoznávají složky myelinových pochev neuronů, např. MBP (myelin basic protein), PLP (proteolipid protein) a MOG (myelin oligopeptid protein) (Ota et al., 1990). Takto aktivované T lymfocyty maturují do CD4⁺ pomocných T lymfocytů populací Th1 a Th17 a migrují do CNS. Spolu s nimi CNS infiltrují v periférii aktivované autoreaktivní B lymfocyty a monocyty. V CNS se rozvíjí zánět, při němž dochází k poškození nervové tkáně. Vstup do CNS nemusí být zprostředkován pouze přes zvýšenou propustnost hematoencefalické bariéry (HEB), ale i skrze krev a mozkomíšní mok (CSF) v choroidálním plexu (Dendrou, Fugger, & Friese, 2015).

Pokud bereme v úvahu, že počátek nemoci nastává v CNS, daný spouštěcí faktor musí být tedy přítomen přímo v mozku. Jako tento spouštěcí faktor bývají označovány zejména virové a bakteriální infekce napadající mozkovou tkáň. K infiltraci CNS autoreaktivními buňkami z periferie zde dochází vlivem již probíhajícího zánětu v mozku. Vznik zánětu v CNS bývá také přisuzován mikrogliím a astrocytům, aktivovaným prozánětlivým mikroprostředím s interferonem- γ (IFN- γ) (Bsibsi et al., 2014), které produkují řadu prozánětlivých cytokinů,

chemokinů a kyslíkových radikálů (ROS) a přispívají tak k poškození myelinu a neurodegeneraci (Friese, Schattling, & Fugger, 2014). Makrofágy také mohou přímo poškozovat myelin přes jimi produkované proteolytické enzymy (např. metaloproteinázy) a kyslíkové radikály (Friese, Schattling, & Fugger, 2014).

V počáteční fázi onemocnění je markantní nárůst zánětu a vznikají léze v šedé hmotě a je pozorována atrofie mozku. Tyto časné léze infiltrují makrofágy, poté $CD8^+$ T lymfocyty a méně $CD4^+$ T lymfocyty, B lymfocyty, případně plazmatické buňky. $CD8^+$ T lymfocyty zde produkují zánětlivý cytokin IL-17, $CD4^+$ T lymfocyty jsou zdrojem IFN- γ a B lymfocyty produkují zánětlivý cytokin IL-6 (Barr et al., 2012). Postupem času se tento zánět indukující infiltrát šíří a tím je způsobena rozsáhlejší demyelinizace axonů vedoucí k jejich poškození a neurodegeneraci, ve které se zdá hrát Th17 buňky důležitou roli (Kebir et al., 2007). Při dalším průběhu nemoci klesá infiltrace mozku autoreaktivními buňkami. Stále pokračující patogeneze je pak zapříčiněna pokračující aktivací makrofágů a astrocytů, které zde udržují zánět skrze jimi produkované zánětlivé faktory. Vznikají tak další léze a pokračuje poškození nervové tkáně ústící ve zhoršení klinického průběhu RS. Patologie jednotlivých subtypů (viz dále) tohoto onemocnění se v některých aspektech vzhledem k rozdílnému průběhu atak a remisí liší.

Dle průběhu onemocnění se RS rozděluje na 4 základní subtypy, viz Tabulka 1. (Havrdová, 2000). Mimo tyto 4 základní subtypy se v některých studiích již relabující progresivní typ nezařazuje (Lublin et al., 2014). Úspěšná a efektivní terapie je však stále v nedohlednu a neexistuje na toto onemocnění doposud lék. Současná terapie je pouze symptomatická a udržovací, snažící se zmírnit projevy, nikoliv kauzální.

Tabulka 1: Typy roztroušené sklerózy, jejich průběh a možnosti terapie

Typ	Zastoupení	Průběh	Terapie
Relaps-remitentní	Nejčastější forma postihující až 85% pacientů.	Střídání atak s remisemi i několik let, kdy se ataky zhoršují a remise zkracují. Pozorovatelná zánětlivá ložiska v bílé hmotě	Imunoglobuliny a imunosupresiva, např. Natalizumab
Sekundárně progresivní	Postihuje až 80% pacientů s relaps remitentní po období cca 10-20 let.	Období remisí po atace nenastává	Imunoglobuliny a interferon β

		Rozsáhlejší axonální ztráta, atrofie a úbytek objemu mozku	
Primárně progresivní	Diagnostikována u přibližně 10% pacientů s RS.	Nedochází zde k náhodným atakám a progresivní úpadek mozkových funkcí nastává pozvolna od začátku	Cytostatika a kortikoidy
Relabující progresivní	Nejméně častá varianta postihující okolo 3% pacientů s RS.	Ataky s těžkými následky u nervových funkcí a téměř žádná období remise	Interferony, cytostatika a kortikoidy

Zdroj: Havrdová, 2000.

2.2. Příčiny onemocnění

RS je multifaktoriální onemocnění, přesná příčina zůstává stále neurčena. Za obecně přijímané schéma se udává propuknutí onemocnění u geneticky vnímavého jedince za přispění celé řady environmentálních faktorů (Ascherio & Munger, 2007).

2.2.1. Neinfekční faktory

Mezi důležité neinfekční faktory patří genetické faktory. RS se vyskytuje častěji u příbuzných osob, kde nejvyšší pravděpodobnost onemocnění je až 30 % u jednovaječných dvojčat, což poukazuje na signifikantní roli genetické determinace (Kuusisto et al., 2008). V souvislosti se zvýšenou vnímavostí k RS se v poslední době uvádí okolo 50 genů, které mají asociaci s tímto onemocněním. Geny považované za hlavní původce vnímavosti pro RS jsou HLA (human leucocyte antigen) geny. Tyto geny kódují proteiny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), který je zodpovědný za vystavení antigenů pro T lymfocyty. Genetický polymorfismus HLA genů u lidí má za následek více alel, kde pouze některé jejich kombinace zapříčiňují vnímavost k RS. Alela nejvíce spojovaná s rizikem RS je HLA DRB1*15:01 (Mosca et al., 2017). Mezi další geny zkoumané pro souvislost s RS patří geny komponentů imunitního systému jako např. geny pro TCR (T-cell receptor) řetězce, geny pro některé podjednotky komplementu a geny kódující tumor nekrotizující faktor (TNF), patřící mezi prozánětlivé cytokiny (Patsopoulos et al., 2013).

Významnou úlohu má také pohlaví. Častější výskyt RS je u žen, oproti mužům v poměru cca 2:1 (Orton et al., 2006).

Vliv na dispozice k RS mají i geografické faktory, kde s rostoucí zeměpisnou šířkou roste i prevalence RS (Kurtzke, 2000). Rasová vnímavost k RS je rozdílná, nejvíce náchylná je indoevropská rasa, méně rasa černá a nejméně orientální. Ovšem jsou i populace, kde se RS téměř nevyskytuje, jako tomu je u Inuitů a amerických indiánů (Marrie, 2004). Mezi oblasti s vysokou prevalencí patří například severní Evropa, severní část USA, jižní oblast Kanady, jih Austrálie a Nový Zéland (Atlas of MS, 2013).

Se vznikem RS je spojovaný i nedostatek slunečního záření a s tím související snížená hladina vitamínu D, navíc je deficit obou těchto faktorů přítomen u nemocných RS (van der Mei et al., 2003). Také kouření a v neposlední řadě přílišná hygiena spolu s vysokou mírou urbanizace jsou řazeny mezi faktory ovlivňující vznik RS (Correale & Gaitán, 2015).

2.2.2. Infekční faktory

Nejčastěji zkoumanými infekčními původci RS jsou viry, z nich především Epstein-Barr virus (EBV). Zvýšené titry protilátek proti Epstein-Barr nukleárnímu antigenu 1 (EBNA-1) v séru patří mezi velmi dobré ukazatele zvýšeného rizika vzniku RS (Mentis et al., 2017). V poslední době se však ještě lepším kandidátem oproti EBV jeví virus lymfocytické choriomeningitidy (LCMV), jehož antigeny mají k MBP větší strukturní homologii než EBNA-1 (Hogeboom, 2015). Také lidský neurotropický herpesvirus HHV6, *herpes simplex* 1 virus, lidské endogenní retroviry či lidský cytomegalovirus jsou zkoumány v epidemiologických, zvířecích a *in vitro* studiích v souvislosti s výskytem RS (Hogestyn et al., 2018). Kromě virů jsou i některé bakteriální infekce považovány za spouštěče onemocnění, jako tomu je u *Chlamydia pneumoniae* (Parratt et al., 2008).

Vliv parazitárních infekcí na vznik RS bude diskutován v samostatné kapitole.

2.3. Zvířecí modely RS

Pro lepší pochopení neurologických, imunologických, degradačních a reparačních procesů u RS a její následnou možnou léčbu jsou v biomedicinském výzkumu využívány zvířecí modely RS. Při jejich použití je však nutné mít na zřeteli, že poznatky ze zvířecích modelů nemusí být vždy úspěšně implementovány do klinických testů a léčby u lidí. Progrese zvířecího onemocnění a lidské RS se přeci jen liší a ne zcela stejné mechanismy a funkce imunitních buněk u lidí a zvířat mohou hrát roli u odlišných výsledků studií (Ransohoff, 2012). Přesto nám tyto modely poskytují nepostradatelné poznatky ohledně tohoto onemocnění.

2.3.1. Experimentální autoimunitní encefalomyelitida (EAE)- základní zvířecí model RS

Tato skupina zvířecích modelů je při výzkumu RS využívána nejvíce a oproti TMEV (viz dále) není vázaná pouze na myši, ale používá se i u morčat, krys a opic. EAE je typicky vyvolána v geneticky vnímavém inbredním kmeni myši (nejčastěji C57BL/6 kmen) aktivní imunizací proteinem či peptidem nebo pasivním přenosem encefalitogenních T lymfocytů. Daný imunogen použitý při imunizaci je odvozen od vlastních proteinů CNS jako např. MBP nebo proteolipid protein (PLP) spolu s oligodendrocytárním glykoproteinem (MOG) v emulzi s Freundovým adjuvans, což je suspenze usmrcených mykobakterií kmene BCG v purifikovaném oleji. V rámci imunizace jsou myši také pro umocnění odpovědi humorální imunity a vyvolání symptomů podobným relapsně remitentnímu subtypu RS, injikovány toxinem bakterie *Bordetella pertussis*, původce černého kašle (Kabat, Wolf, & Bezer, 1947). U myši kmene SJL/J imunizovaných dominantním epitopem PLP se rozvíjí relapsně remitentní subtyp, naopak imunizací kmene C57BL/6 u myši dochází k rozvoji subtypu s chronickým průběhem. (Procaccini et al., 2015).

Relapsně remitentní subtyp EAE má po prvotní atace několik relapsů a remisí a může být vyvolán pasivním transferem PLP reaktivních T lymfocytů izolovaných z periferních lymfoidních buněk imunizované myši do naivní myši. Na tomto modelu bylo pozorováno zapojení CD4⁺ T lymfocytů při patologii RS. Tento model je aplikován při studiu aktivace imunitního systému a zánětlivých procesů v CNS při EAE (McRae et al., 1992).

Chronický subtyp EAE je indukován vysokými dávkami MOG peptidu a adjuvans, při nízkých dávkách dojde k indukci relapsně remitentního typu EAE. Na tomto modelu bylo pozorováno zapojení CD8⁺ T lymfocytů, CD4⁺ T lymfocytů, B lymfocytů a monocytů do patologie RS. Využití tohoto subtypu je stejné jako u relapsně remitentní EAE (Mendel et al., 1995).

Nejen tyto dva základní typy EAE slouží ke studiu rolí lymfocytů a dalších buněk působících v patogenezi RS. Recentně se například používá model vyvolávající EAE u non obese diabetic (NOD) myši, kde autoreaktivní CD8⁺ T lymfocyty způsobují optickou neuritidu a pouze mírnou formu EAE. Oproti tomu zde CD4⁺ T lymfocyty jsou schopny vyvolat závažnější formu EAE a ukazují tak svou centrální roli v patogenezi (Anderson et al., 2012). Také průběh nemusí být striktně chronický či relaps-remitentní, jako je tomu u modelu EAE u transgenní myši (s MOG specifickým TCR), přes imunizaci MOG na C57BL/6 kmeni, kde díky epitop reaktivního klonu T lymfocytu je průběh EAE agresivnější než u relaps-remitentního subtypu vyvolaného přes PLP (Bettelli et al., 2003).

Přestože histopatologie EAE připomíná RS a EAE významně přispěla k pochopení a popsání autoimunity, zánětlivých procesů v mozku, chování cytokinů a imunogenetice, je zde stále řada rozdílů limitujících výzkum terapie. Progrese EAE a RS je nadále rozdílná a stále bez imunizace peptidy s adjuvans neumíme EAE vyvolat. Potřeba je také extenzivnější analýzy role B lymfocytů i T lymfocytů. U EAE totiž hlavní roli v patogenezi zaujímají převážně CD4⁺ T lymfocyty, zatímco u lidské RS jsou za to zodpovědné CD8⁺ T lymfocyty (Mix et al., 2010).

1.3.2. Virem indukované zvířecí modely demyelinizace

Modely virových onemocnění u zvířat pomáhají nastínit mechanismus a úlohu imunitního systému hostitele při nákaze a počátku rozvoje RS u lidí. Nejčastěji používaným modelem je virus Theilerovy myši encefalomyelitidy (TMEV), který patří mezi neurotropické picornaviry. Tento virus je schopen způsobit demyelinizaci v CNS. Jeho TO subtyp způsobuje akutní polioencefalomyelitidu. V chronické fázi napadá TMEV buňky myeloidní linie, oligodendrocyty a astrocyty. Snížení počtu těchto buněk a k TMEV specifické CD4⁺ T lymfocyty vedou k virem indukované demyelinizaci. U *in vivo* experimentu byla také pozorována cytotoxická aktivita CD8⁺ T lymfocytů a zvýšená exprese adhezivních molekul při TMEV indukované demyelinizaci (Njenga, Marques, & Rodriguez, 2004). Takto vzniklé patologické projevy jsou podobné těm u RS. Tento model má potenciál při výzkumu nových terapeutik, zaměřených na imunosupresi a proti axonální degeneraci. Negativním (a s ohledem na bezpečnost práce zároveň i pozitivním) faktorem u TMEV je jeho neschopnost infikovat jiné organismy než myši. Průběh onemocnění je také vždy pouze chronický. Méně využívaný u zvířecích modelů demyelinizace je neurotropický virus myši hepatitidy (MHV), koronavirus, jehož jeden kmen způsobuje demyelinizaci. MHV má podobnou histopatologii jako TMEV, ale při infekci zde dochází k zánětlivé demyelinizaci i při absenci detekované genové exprese viru, kde za demyelinizaci může imunitní odpověď hostitele s produkcí zánětlivých cytokinů (Biswas et al., 2016).

2.3.3. Toxické modely demyelinizace a remyelinizace

Modely pro lepší pochopení remyelinizace, jakožto reparačního procesu pro demyelinizaci způsobenou progresivitou nemoci, jsou esenciální a mají velký potenciál pro terapii jedince s již poškozenou tkání. Ačkoliv tento proces přirozeně probíhá při regeneraci axonů, u RS je utlumen nebo vyřazen, proto je žádoucí modelování vyvolání a zvýšení produktivity tohoto procesu u zvířecích modelů RS. Problémem toxických modelů pro demyelinizaci a remyelinizaci však je chybějící imunitní odpověď.

V současnosti hojně zkoumaný je tzv. copper chelator cuprizone model. Chelační činidlo kuprizon má selektivní toxicitu pro oligodendrocyty v CNS a tím způsobuje jejich úmrtí a vznik lézí. Po vymizení kuprizonu ze systému pozorované myši nastává remyelinizace. Demyelinizace zde probíhá podobně jako u 3. typu RS a při vzniku léze fungují oba mechanismy současně (Varga et al., 2018). Mezi významné modely patří také lysolecithin/ethidium bromid model. Mikroinjekce jedné z těchto látek do bílé hmoty myši způsobuje okamžitou demyelinizaci, po které následuje remyelinizace. Tento model slouží převážně pro identifikaci buněčných a molekulárních determinantů remyelinizace (Blakemore & Franklin, 2008).

3. Úloha parazitů v etiologii RS

Vzhledem k propojení bakteriálních a virových nákaz s etiologií RS je nutno zabývat se i možným vlivem parazitárních nákaz na spuštění tohoto onemocnění.

3.1. *Toxoplasma gondii*

Původcem jedné z nejrozšířenějších protozoárních infekcí, celosvětově postihující téměř třetinu lidské populace (Hill, Chirukandoth, & Dubey, 2005), je intracelulární kokcidie *Toxoplasma gondii*. Konečným hostitelem toxoplazmy jsou kočkovité šelmy, mezihostiteli pak teplokrevní obratlovci včetně člověka. Kromě jiných orgánů infikuje v mezihostitelích toxoplazma také mozek, kde vytváří intraneuronální tkáňové cysty. Především v počáteční fázi infekce je mozek infiltrován $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocyty, které produkují prozánětlivé cytokiny (Blanchard, Dunay, & Schlüter, 2015). U imunosuprimovaných jedinců místo nástupu latentní fáze, kdy počet T lymfocytů v CNS postupně klesá, dochází k reaktivaci toxoplazmózy a rozvoji život ohrožující encefalitidy jí způsobenou (Montoya & Liesenfeld, 2004). Právě infekce *T. gondii* je spojována s vyšší permeabilitou HEB u C57BL/6 myši a tato vyšší propustnost vede k větší infiltraci zánětlivých T lymfocytů do CNS (Silva et al., 2010). Napovídá tomu i zvýšená hladina zánětlivých faktorů IFN- γ a indukibilní NO syntázy (iNOS) v CNS. V této studii je zkoumána také korelace mezi zvýšenou expresí adhezivních molekul ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), ALCAM (activated leucocyte adhesion cell molecule) s VCAM-1 (vascular adhesion cell molecule 1) a zvýšenou intenzitou vlivu nemoci na myši skrze vyšší migraci zánětlivých buněk do CNS. Pouze u ALCAM je však naznačena asociace se zvýšeným počtem těchto adhezivních molekul a zvýšenou migrací $CD4^+$ T lymfocytů do mozku.

I když by se s ohledem na uvedené skutečnosti mohla toxoplazma jevit jako ideální kandidát na spouštěče RS, dosavadní studie tomu nenasvědčují. U pacientů s RS byla pouze v jednom

případě popsána cerebrální toxoplazmóza. Ta se však rozvinula v důsledku podávání imunosupresivního léku Fingolimod RS pacientovi, který zároveň trpěl latentní toxoplazmózou (Enriquez-Marulanda et al., 2017). Tato studie tedy nepoukazuje na vlastní spouštěcí roli *T. gondii*, ale potvrzuje její oportunní patogenitu u imunokompromitovaného subjektu. Roli spouštěče nepodporuje ani studie, kde pacienti s RS (n = 163) vykázali dokonce signifikantně nižší séroprevalenci toxoplazmózy oproti kontrolní skupině (n = 178) podobného věkového a genderového složení (Stascheit et al., 2015). Toto bylo pozorováno i v další studii, kdy se u pacientů s RS vyskytovala nižší séroprevalence *T. gondii* než u zdravé kontrolní skupiny; u pacientů s RS a *T. gondii* byl dokonce pozorován menší výskyt relapsů než u parazitem nenakažených (Koskderelioglu et al., 2017). Tyto výsledky tak naznačují možný ochranný vliv *T. gondii* vůči RS. Při dalším zkoumání propojení incidence imunitních a neurologických onemocnění s přítomností této kokcidi se opět nepodařilo prokázat toto propojení naznačující její spouštěcí roli (Flegr & Escudero, 2016). Z důvodu objasnění vztahu *T. gondii* a nejen RS, ale i dalších onemocnění je nutno podrobit tuto problematiku důkladnějšímu, rozsáhlejšímu a kritickému zkoumání, přeci jen je tento parazit celosvětově hojně rozšířený.

Možné protektivní účinky nákazy *T. gondii* budou diskutovány v následujících kapitolách.

3.2. *Acanthamoeba castellanii*

Možným spouštěčem RS se na rozdíl od toxoplazmy ukázala améba *Acanthamoeba castellanii*. Ta u lidí běžně způsobuje amébovou keratitidu, závažnější projevy má však u osob se sníženou imunitou, u nichž vyvolává granulomatózní amébovou encefalitidu. *A. castellanii* obsahuje mimikrové epitopy pro PLP a u SJL/J myši inokulovaných dávkou peptidu *A. castellanii* (ACA₈₃₋₉₅) došlo k vyvinutí závažnější formy EAE než u myši inokulovaných PLP₁₃₉₋₁₅₁ (Massilamany, Steffen, & Reddy, 2010). V takto nakažených myších byly pozorovány myelin reaktivní pouze CD4⁺ T lymfocyty. Přibližně stejné početní zastoupení měly i CD8⁺ T lymfocyty, které však reaktivitu vůči myelinu neměly. Přenosem Th1 cytokiny produkujících buněk zastoupených převážně lymfocyty a makrofágy do naivní populace SJL/J myši se jimi následně podařilo vyvolat EAE (Massilamany et al., 2011a; Massilamany et al., 2014).

Ve vzniklých mozkových lézích pak byly imunohistochemicky identifikovány makrofágy a lymfocyty. Naproti tomu jen malé množství myši vykazovalo zánět v míše a jen malé množství vzorků obsahovalo nepříliš rozsáhlou demyelinizaci. Pozdější studie odhalila u *A. castellanii* další mimikrový epitop NAD₁₀₈₋₁₂₀, který iniciuje tvorbu cross reaktivních T lymfocytů pro MBP₈₉₋₁₀₁ a vyvolává tak encefalomyelitidu (Massilamany et al., 2011b). Tyto T lymfocyty produkují primárně Th1 a Th17 cytokiny. Schopnost generovat cross reaktivní buňky proti

lidskému MBP₈₅₋₈₉ má odvozená homologní molekula od NAD₁₀₄₋₁₀₈ se schopností navázat se na HLA DR2 a jeví se tak jako možný spojující můstek pro RS a *A. castellanii*. Dalším zajímavým zjištěním, podobným u lidské RS s její větší incidencí u žen, nežli u mužů je i zvýšená aktivita CNS zánětu vyvolaného *A. castellanii* u samičího pohlaví myši než u samčího v efektorové fázi (Massilamany et al., 2011a). Příčinou tomuto jevu jsou právě encefalitogenní T lymfocyty, které jsou u samců méně patogenní než u samic. Nasvědčují tomu výsledky této studie u transplantace ACA stimulovaných T lymfocytů u samic i u samců a následně transplantovaných opačnému pohlaví. Samičí stimulované T lymfocyty v samcích zpозdily propuknutí nemoci a část vzorků vykazovala relapsy pro samce necharakteristické. Samčí stimulované T lymfocyty v samicích naopak až ve 40 % případů nedokázaly vyvolat onemocnění a u ostatních byl průběh EAE mírnější, přestože obě populace ať už samičích či samčích stimulovaných T lymfocytů produkovaly stejné množství prozánětlivých cytokinů. Z pozorování vyplývá i fakt, že obě pohlaví jsou k vyvolání nemoci stejně citlivá, pouze ACA stimulované T lymfocyty mají rozdílnou míru patogenity. Vyvolání encefalomyelitidy u myši je potvrzeno i u infekce trofozoity *A. castellanii* (Massilamany et al., 2014).

Přes výsledky experimentů a pozorování není stále dostatečná evidence pro propojení *A. castellanii* a RS. Tento protist sice je schopen vyvolat autoimunitní zánět v mozku, ale otázkou zůstává, zda je tento zánět shodný s RS či pouze podobný. Také sérologická studie na propojení RS a přítomnosti *A. castellanii* je zde pro potvrzení či vyvrácení spouštěcí role tohoto parazita žádoucí.

3.3. *Plasmodium falciparum*

Za zmínku stojí také parazitický protist *Plasmodium falciparum*, původce tropické malárie. Vystává totiž otázka, zda může tento protist stát za zvýšenou prevalencí RS v oblastech, kde byla malárie již dříve eradikována. Některé hypotézy naznačují, že dřívější dlouhodobá stimulace imunity vlivem *P. falciparum* vedla k přetrvávající silné makrofágové produkci zánětlivých cytokinů i po jeho vymizení a zvyšuje tak vnímavost k RS (Sotgiu et al., 2008). Je však nutné podotknout, že tato hypotéza je dosud jen v rovině teoretických úvah a není potvrzena žádnými solidními epidemiologickými ani experimentálními daty.

V kontrastu k výše uvedeným protistům jsou helmintární infekce při RS obecně považovány za spíše prospěšné, jak bude probráno v následujících kapitolách.

4. Vliv parazitů na průběh RS u zvířecích modelů

Helminti¹ způsobují chronické infekce obratlovčích hostitelů, které jsou obvykle spojené s výrazným ovlivněním imunitní odpovědi definitivního hostitele (Maizels & McSorley 2016). Typická je indukce Forkhead box P3+ Treg (Foxp3⁺) a produkce transformujícího růstového faktoru β (TGF- β) a interleukinu 10 (IL-10). Tyto cytokiny vedou B buňky k produkci neutralizačních IgG4, potlačují proliferaci k parazitovi specifických T lymfocytů, snižují hladiny Th2 cytokinů a eliminují Th1 cytokiny. Toto zajišťuje úspěšné a dlouhodobé setrvání parazita v těle definitivního hostitele s minimem vedlejší patologie. Tu naopak pozorujeme v případech, kdy nakažený hostitel produkuje vysoké hladiny Th1, Th2 a Th17 cytokinů a také specifických IgE (McSorley & Maizels, 2012). Pro svůj vysoký imunomodulační potenciál jsou infekce helminty zkoumané i v kontextu možného vlivu na vznik či průběh roztroušené sklerózy, a to jak u zvířecích modelů (tato kapitola), tak u lidských pacientů (viz kapitola 4).

4.1. Helminti s pozitivním vlivem na průběh EAE

4.1.1. *Heligmosomoides polygyrus*

H. polygyrus je střevní hlístice s přímým životním cyklem parazitující u myši. Tato hlístice je široce využívána jako gastrointestinální modelový parazit v imunologických, farmakologických a toxikologických studiích.

Infekce myši s EAE parazitem *H. polygyrus* může změnit klinický průběh EAE (Wilson et al., 2010; Donskow-Łysoniewska et al., 2012). *H. polygyrus* v hostiteli stimuluje tvorbu regulačních T lymfocytů, B lymfocytů a makrofágů. Transferem helmintem indukovaných CD4⁺ T lymfocytů a CD4⁻ buněk z mezenterických lymfatických uzlin donorové myši do akceptorové myši s EAE, došlo u implantace obou těchto populací T lymfocytů ke zmírnění projevů EAE (Wilson et al., 2010). CD4⁺ T lymfocyty byly schopny snížit incidenci onemocnění a maximální klinické skóre. Nicméně CD4⁻ buňky vyvolaly výraznější zlepšení projevů EAE, spolu se sníženou incidencí onemocnění a nižším maximálním klinickým skóre a zajistily tak rozsáhlejší ochranu před EAE, než tomu bylo u CD4⁺ populace. Nezměněné hladiny IFN- γ a IL-4 ve slezině recipientní myši potvrdily, že nedošlo ke změně zastoupení Th1/Th2 populací. Také adoptivním transferem CD19⁺ B lymfocytů z donorové IL-10^{-/-} myši s EAE a *H. polygyrus* došlo k výraznému snížení klinických projevů u recipientní myši, tudíž jsou protektivní účinky těchto B lymfocytů nezávislé na IL-10 a spíše souvisí se zvýšenou sekrecí IL-6. Při další studii vlivu infekce *H. polygyrus* na EAE skrze nakažení EAE myši

¹ Pro účely této práce jsou za helminty považováni parazitičtí zástupci ze skupin Trematoda (motolice), Cestoda (tasemnice) a Nematoda (hlístice).

larvami došlo také ke zlepšení průběhu onemocnění (Donskow-Łysoniewska et al., 2012). Redukce symptomů zde byla spojena s počáteční zvýšenou hladinou IL-12 a snížením IL-17 a IL-2 v krevním séru. Šest dnů po infekci (dpi) bylo naopak pozorováno snížení koncentrace IL-12 v CSF a séru, související se zlepšením příznaků EAE. Larvy *H. polygyrus* v tuto dobu působí proti zánětu (EAE) snížením koncentrace IL-12 a indukcí zvýšené produkce regulačních protizánětlivých cytokinů (TGF- β , IL-6 a IL-10). Také dospělci *H. polygyrus* vyskytující se v myši v době 20 dpi inhibovali EAE, ovšem doposud blíže necharakterizovanými regulačními mechanismy. Tyto mechanismy spojené se snížením koncentrace IL-17A, však byly odlišné od mechanismů působení larev (Donskow-Łysoniewska et al., 2012).

Pozitivní vliv larev na průběh EAE byl potvrzen i v další studii, kdy 6 dpi došlo k výrazné remisi EAE (Donskow-Łysoniewska et al., 2018). Toto zlepšení klinických příznaků bylo spojeno se snížením demyelinizace v CNS a signifikantní regenerací mozkové tkáně. Regenerace nastala v důsledku zvýšené hladiny TGF- β a neurotrofinu NGF, který je spojován s remyelinizací (Althaus, 2004). V tuto dobu byla také u myši s EAE nakažených larvami *H. polygyrus* oproti těm nenakaženým snížena propustnost hematoencefalické bariéry, což omezilo vstup autoreaktivních lymfocytů do CNS. Remise EAE je zde také spojována se zvýšenou koncentrací CD11b⁺ makrofágů, charakterizovaných vysokou expresí receptoru IL-4R (Stein et al., 1992). Tento druh makrofágů je typický protizánětlivou aktivitou a negativním vlivem na proliferaci zánětlivých T lymfocytů spolu s vlivem na opravu poškozené tkáně (Schwartz & Baruch, 2014). Leukocyty získané z CSF a krve z periferií byly CD8⁺CD25^{hi} Foxp3⁺ a CD4⁺CD25^{hi} Foxp3⁺ regulační subpopulace T lymfocytů. Ve srovnání s nenakaženými myši s EAE byly tyto regulační subpopulace četnější v CSF myši s EAE nakažených *H. polygyrus*. Oproti předchozí studii zde bylo v přítomnosti larev pozorováno větší množství regulačních leukocytů v CNS vedoucí k příznivému vlivu na EAE oproti infekci dospělci. (Donskow-Łysoniewska et al., 2018)

Závěrem lze shrnout, že pozitivní imunomodulační efekt na průběh EAE mají jak larvální stadia *H. polygyrus*, tak dospělci, i když patrně používají jiné mechanismy. Larvy jsou schopny skrze produkci IL-6 snížit sekreci IL-12 a zlepšit tak průběh onemocnění spolu se zvýšeným počtem leukocytů v CNS napomáhajícím remisi. Dospělci ovlivňují snížení koncentrace IL-17A a tím nejspíše potlačují rozvoj EAE. Pozitivních účinků na EAE lze dosáhnout i transferem parazitem indukovaných leukocytů do nenakažené myši. Zlepšení projevů EAE se také ukazuje nezávislé na IL-10 a nastává i při zde nepřítomné změně zastoupení Th1/Th2 odpovědi vlivem parazita.

4.1.2. *Trichinella spp.*

Hlístice *T. spiralis* parazituje ve střevě (dospělci) či svalech (larvy) savců (vč. člověka) a ptáků, ojediněle i plazů.

Infekce potkanů larvami *T. spiralis* 28 dní před indukci EAE, pro vývoj svalových larev souběžně s počátkem projevů EAE, vedla k výraznému ústupu onemocnění pouze u skupiny s dávkou 500 a 1000 infekčních larev. Při nižších (100 larev) a vyšších dávkách (2000, 5000 larev) zlepšení klinického stavu pozorováno nebylo. Protektivní vliv larev *T. spiralis* tudíž závisí na velikosti infekční dávky (Gruden-Movsesijan et al., 2008). Příliš malá nemusí mít dostatečně silné imunomodulační účinky a při příliš velké zase hrozí projev vlastní patogenity parazita. Snížení závažnosti EAE a jejího trvání spolu se sníženým hodnotami infiltrace zánětlivých T lymfocytů a makrofágů v míše a mozku, zde jasně ukazuje na redukci zánětu v CNS vlivem parazita. Následná studie vlivu infekce *T. spiralis* na EAE transferem populací CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T lymfocytů z donorového potkana nakaženého *T. spiralis*, prokázala zmírnění projevů EAE u recipientního jedince. Toto zlepšení projevů bylo doprovázeno zvýšenou produkcí IL-10 a IL-4 spolu se sníženou produkcí IFN- γ a IL-17 v lymfatických uzlinách (Gruden-Movsesijan et al., 2010).

Jako parazitární molekuly zodpovědné za imunomodulaci byly identifikovány exkrečně-sekreční produkty larev *T. spiralis* (ES L1). Stimulace dendritických buněk ES L1 vede k jejich částečné maturaci v závislosti na množství parazitárního antigenu. *In vivo* aplikace takto stimulovaných DC do naivního příjemce vede ke zvýšené produkci IL-10, IL-4 a TGF- β a zároveň snížení produkce IFN- γ a IL-17 ve slezině (Sofronic-Milosavljevic et al., 2013). Ve slezině a míše byl pozorován nárůst CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T lymfocytů. Tato populace T lymfocytů a zvýšená hladina IL-10 a jsou zapojeny do omezení produkce Th1 a Th17 cytokinů a zodpovědné za protektivní účinky vůči EAE. Podrobená zkoumání zde byla i fluktuace hladiny IL-10 v průběhu onemocnění v závislosti na dřívější studii, kde byl IL-10 charakterizován jako jednoznačný Th2 parametr u myši (Vandebriel et al., 2000). Zde byl IL-10 označen jako hlavní cytokin vedoucí k tolerantní Th2 odpovědi spolu s přispěním TGF- β a IL-4.

V návaznosti na předchozí studii vlivu ES L1 se Radovic *et al.* (2015) dále věnoval vlivu ES L1 na EAE injekcí těchto antigenů do peritonea potkana ještě před imunizací autoantigenem. Začátek onemocnění zde nebyl pozměněn, oproti tomu doba trvání EAE byla výrazně kratší a klinické skóre dosahovalo nižších hodnot oproti neinfikovaným. V míše pak byla po celou dobu sledování pozorována snížená hladina IFN- γ produkovaného infiltrujícími T lymfocyty. V

efektorové a remisivní fázi byla v míše naopak přítomna vyšší koncentrace IL-10 a IL-4. Oproti tomu výrazné zvýšení koncentrace TGF- β bylo pozorováno pouze ve fázi remisivní a není tedy příčinou protektivního vlivu ES-L1 na EAE. Kromě zvýšeného procenta CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T lymfocytů v míše, zde bylo překvapivě detekováno významné zastoupení nekonvenčních regulačních CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T lymfocytů. Samotná infekce *T. spiralis* či transfer ES L1 stimulovaných DC k její produkci nestačí.

Protektivní efekt lze pozorovat i u myši s EAE, infikovaných příbuzným druhem *T. pseudospiralis*. Tyto myši také vykazují silnou Th2 polarizaci a utlumení Th1 a Th17 imunitní odpovědi, což ve výsledku vede ke snížení závažnosti EAE (Wu et al., 2010).

Protektivní imunomodulace u myši s EAE lze docílit i spojením vlivu několika helmintů, byť přesné mechanismy této synergie ještě nejsou popsány. Kombinací rozpustných produktů (SP) hlístic *Trichuris suis*, *Trichinella spiralis* a rozpustných antigenů vajíček (SEA, z angl. soluble egg antigens) *S. mansoni* lze potlačit produkci prozánětlivých Th1 a Th17 cytokinů a polarizovat Th2 přes modulaci lidských DC vpravených do recipientní myši s EAE (Kuijk et al., 2012). Tento mix antigenů je však odlišný od ES L1 a různé parazitární produkty cílí na různé regulační dráhy. Jejich výsledný efekt na EAE se však ve výsledku příliš neliší a dochází ke zmírnění projevů onemocnění.

V souhrnu lze říci, že podáním *T. spiralis* larev a podáním přímo jejích ES-L1 dochází v obou případech ke zlepšení průběhu EAE. Navíc podání přímo ES se zdá i z hlediska indukovaných populací T lymfocytů výhodnější. Vpravením ať už L1 stádia či parazitem stimulovaných T lymfocytů, jejich ES stimulovaných DC nebo podáním samotných ES produktů, za působení různých mechanismů dojde k polarizaci Th2 v závislosti na zvýšené koncentraci IL-10 (narozdíl od *H. polygyrus*) a zlepšení průběhu EAE. S *H. polygyrus* naopak shodně zvyšují koncentraci Treg a snižují infiltraci zánětlivých buněk do CNS.

4.1.3. *Taenia crassiceps*

T. crassiceps je tasemnice parazitující ve střevě psovitých šelem, jako meziphostitele využívá malé hlodavce.

Infekce *T. crassiceps* má u myši pozitivní vliv na EAE a její symptomy (Reyes et al., 2011). Příznivé účinky *T. crassiceps* jsou spojovány s poklesem produkce MOG specifických splenocytů produkujících IL-17. Oproti tomu došlo k nárůstu produkce IL-4 a IL-10 MOG specifickými splenocyty, což ukazuje na proliferaci Th2 lymfocytů. Pozitivní efekt autoři přisuzují i omezené infiltraci nervové tkáně leukocyty. Analyzovali však pouze histologické

řezy, a tak nebylo možné určit konkrétní populace infiltrujících buněk a jejich zastoupení (vhodnější by bylo využít průtokovou cytometrii). Překvapivě se neprokázalo zvýšení infiltrace CNS nakažených myši $CD3^+$ $Foxp3^+$ Treg, což naznačuje, že protektivní vliv *T. crassiceps* na EAE je zapříčiněn snížením infiltrace zánětlivých T lymfocytů do CNS a jeho nezávislost na $Foxp3^+$ T lymfocytech je rozdílná ve srovnání s dosud uváděnými helminty. Významným rysem infekce myši *T. crassiceps* je parazitem indukovaná diferenciací alternativně aktivovaných makrofágů, které při EAE omezují proliferaci zánětlivých T lymfocytů.

Tyto AAM neboli alternativně aktivované makrofágy, derivované z krevních monocytů, se při infekci akumulují i v peritoneu a exprimují na svém povrchu ligand programované smrti 2 (PD-L2) a manózoový receptor (MR), marker alternativní aktivace. Adoptivním transferem těchto $PD-L2^+$ AAM do myši s indukovanou EAE došlo k viditelnému potlačení autoreaktivity T lymfocytů i ke zmírnění intenzity klinických projevů EAE (Terrazas et al., 2017). $PD-L2^+$ makrofágy nepolarizují imunitu striktně k Th2, spíše svým účinkem potlačují aktivaci T lymfocytů a jejich infiltraci do CNS spolu s downregulací $IFN-\gamma$ a IL-17. Toto pozorování je v kontrastu proti předchozí studii, kde se hladina $IFN-\gamma$ nezměnila oproti neinfikovaným myším. Schopnost potlačit projevy EAE je tak spojována právě s expresí molekuly PD-L2, jejíž regulační účinek při EAE byl již popsán (Salama et al., 2003).

Nejen přímá nákaza *T. crassiceps*, ale i injekce jejích exkrečně-sekrecčních produktů (TcES) do myši s EAE vyvolala zmírnění projevů a zastavení progresu onemocnění podobně přes stimulaci Th2 odpovědi, jako tomu je i u infekce přímo parazitem (Peón et al., 2017). TcES indukují zvýšení počtu AAM a supresorových buněk odvozených od myeloidní linie (MDSC) v peritoneu. Ve splenocytech přitom dochází ke značnému potlačení patogenní MOG specifické odpovědi a nastolení hyporesponzivního prostředí skrze zvýšení produkce IL-10 a IL-4 a zároveň snížení produkce $TNF-\alpha$ a IL-17A. Zlepšený průběh u EAE však byl závislý na neustálé administraci TcES, v opačném případě se ve slezině opět zvýšila koncentrace $CD4^+$ T lymfocytů produkujících $TNF-\alpha$ a IL-17, současně zde došlo také ke snížení počtu $CD4^+$ T lymfocytů produkujících IL-10.

I u *T. crassiceps* je tedy možnost použít místo živého parazita jeho ES. Parazit opět stimuluje odpověď k Th2, avšak nepodporuje proliferaci Treg. Navíc oproti jiným parazitům u infekce *T. crassiceps* dochází k zapojení AAM do protektivních mechanismů vůči EAE, avšak nepodporuje proliferaci Treg.

4.1.4. *Schistosoma spp.*

S. mansoni je motolice vyvolávající u člověka závažné onemocnění schistosomózu. Celosvětově je touto nemocí nakaženo 240 miliónů lidí (WHO, 2018). Mezihostitelem jsou vodní plži z rodu *Biomphalaria* a mezi definitivní hostitele mimo člověka patří další primáti a hlodavci.

Vliv infekce *S. mansoni* patří do zkoumaných supresivních mechanismů u myši s EAE. Pro studium imunomodulačního potenciálu schistosom se používají především vajíčka, která dlouhodobě přetrvávají ve tkáních hostitele.

Myši imunizované vajíčky *S. mansoni*, u nichž byla posléze vyvolána EAE, vykazovaly nižší patologii a opoždění manifestace v iniciační fázi (Sewell et al., 2003). Během infekce byly ve slezině zaznamenány zvýšené hladiny IL-4, TGF- β a IL-5 spolu s poklesem množství IFN- γ . Výrazně snižená byla i infiltrace zánětlivých buněk do CNS a produkce PLP specifických T lymfocytů produkujících IFN- γ oproti zvýšené produkci IL-4. Fakt, že snižená hladina těchto IFN- γ produkujících T lymfocytů se vyskytovala pouze v mozku, a ne ve slezině poukazuje na lokální regulaci cytokinů právě v mozku. Uvedené výsledky naznačují závislost protektivního efektu vajíček schistosom při EAE na Th2 lymfocytech. To bylo potvrzeno při použití myši postrádajících protein STAT6, zapojený do kontroly Th2 polarizace buněk (Chitnis et al., 2001). U těchto myši nemělo podání vajíček schistosom na průběh EAE žádný vliv.

Oproti předchozí studii zaměřené na preimunizaci myši vajíčky *S. mansoni*, protektivních účinků lze dosáhnout i imunizací cercáriemi *S. mansoni*, z nichž se vyvinou dospělci, kteří po cca 6 týdnech (doba indukce EAE) kladou vajíčka (La Flamme et al., 2003). Jde tedy o design, který respektuje přirozený průběh infekce. Naklazení vajíček způsobuje u hostitele silnou Th2 imunitní odpověď. Ve splenocytech bylo pozorováno snížení množství IFN- γ , NO, TNF- α a výrazně snížené množství IL-12p40 mRNA. Podobně jako u preimunizace i zde dochází ke snížení infiltrace makrofágů a T lymfocytů do CNS. *S. mansoni* tudíž stejně jako *T. crassiceps* a *T. spiralis* polarizuje imunitu směrem k Th2 odpovědi.

Také molekula nacházející se na povrchu vajíček *S. mansoni* LNFPIII výrazně snížila klinické projevy EAE (Zhu et al., 2012). Vlivem tohoto glykanu došlo ke zlepšení projevů EAE snížením proliferace zánětlivých buněk (CD4⁺T lymfocytů a CD11c⁺) přes produkci NO. Podobně jako u infekce přímo *S. mansoni* i zde dochází k polarizaci Th2 imunitní odpovědi skrze protizánětlivé cytokiny (IL-4, IL-5, IL-10 a IL-13).

Své místo při studiu vlivu parazitů na průběh EAE v myších modelech má i příbuzná *Schistosoma japonicum*. SEA u myši s EAE způsobily snížení produkce IFN- γ a zvýšení produkce IL-4 ve slezině a mozku, vedoucí k Th2 mikroprostředí a potlačení progresu a projevů EAE (Zheng et al., 2008).

4.1.5. *Fasciola hepatica*

F. hepatica je celosvětově rozšířený parazit žlučových ovcí, skotu a dalších savců člověka nevyjímaje. Mezihostiteli jsou plovatkovití plži.

Experimentální infekce myši s EAE *F. hepatica* vede ke zmírnění klinických projevů a průběhu EAE. Ve slezině takto nakažené myši dochází ke snížení produkce autoantigen (MOG) specifických T-lymfocytů produkujících IL-17 a IFN- γ a zvýšení koncentrace MOG specifických T-lymfocytů produkujících IL-10 a TGF- β . Přestože IL-10 potlačuje Th1 a Th2, potlačení expanze prozánětlivých T lymfocytů, a tedy i potlačení klinických příznaků EAE není zprostředkováno tímto cytokinem, jak prokázaly experimenty s IL-10^{-/-} myši. Za snížení projevů EAE je zodpovědný TGF- β , který inhibuje patologickou Th1 a Th17 odpověď (Walsh et al., 2009).

V další studii myšího modelu EAE byly testovány exkrečně-sekreční produkty *F. hepatica* (FHES). Po jejich podání myším došlo k výraznému snížení infiltrace Th1 a Th17 buněk do mozku, což vedlo k signifikantnímu oslabení EAE (Finlay et al., 2016). V mozkové tkáni pak byla pozorována zvýšená koncentrace Th2 cytokinů IL-4 a IL-13. Zajímavé však oproti ostatním modelům bylo zmírnění projevů EAE nezávisle na helminty ovlivněné produkci cytokinů IL-4 a regulačních T lymfocytů. FHES naopak zvýšily produkci IL-33 a IL-5, které zapříčinily expanzi eozinofilů do CNS. Adoptivním transferem těchto FHES indukovaných eozinofilů do myši s EAE došlo ke zmírnění závažnosti EAE a potvrzení jejich protektivního vlivu na EAE (Finlay et al., 2016). Eozinofily totiž mimo jiné dokáží fungovat jako antigen prezentující buňky (APC) a ovlivnit tak výsledný typ T lymfocytů a polarizovat je k supresivnímu fenotypu, který má protektivní vliv (Akuthota et al., 2008).

Potenciál v léčbě EAE má i další peptid produkovaný tímto parazitem FhHDM-1 (imunomodulační peptid produkovaný *F. hepatica*). Tento peptid je schopný zmírnit klinické symptomy EAE bez ovlivnění počtu a funkce autoreaktivních T lymfocytů. Místo toho omezuje schopnost makrofágů produkovat prozánětlivé cytokiny (TNF- α , IL-6) (Lund et al., 2016).

F. hepatica je tedy dalším helmintem s prokázaným zmírněním průběhu EAE jeho vlivem. Nejen parazit samotný, ale i jeho ES jsou schopny docílit potlačení EAE. Navíc FHES oproti

zmíněným jiným parazitárním antigenům indukuje eozinofilii s protektivním účinkem. Právě vliv eozinofilů se zde zdá stěžejní pro zmírnění projevů EAE oproti Th2 lymfocytům a protizánětlivým cytokinům Treg, jako tomu je jinde. Oproti tomu další molekula sekretovaná *F. hepatica* FhHDM-1 cílí zase na potlačení makrofágové produkce TNF- α a IL-6.

4.2. Helminti s negativním vlivem na průběh EAE

Přestože jsou helminti považováni za parazity s pozitivním vlivem na EAE a RS, není tomu tak u všech. Protein získaný z helminta *Toxascaris leonina* prokázal zcela opačný negativní efekt a způsobil tak zhoršení průběhu EAE.

4.2.1. *Toxascaris leonina*

T. leonina je kosmopolitně rozšířená hlístice parazitující v tenkém střevě definitivního hostitele. Mezi její paratenické hostitele patří hlodavci, zejména pak myši a krysy a definitivním hostitelem jsou psovitě a kočkovitě šelmy.

T. leonina produkuje protein homologní k myšímú galektinu Gal-9 (Tl-gal), který je ligandem pro T lymfocytární imunoglobulinovou a mucinovou doménu 3 (Tim-3). Tim-3 se vyskytuje na povrchu Th1 CD4⁺ T lymfocytů, CD8⁺ T lymfocytů, makrofágů, monocytů a DC. Po navázání Gal-9 na Tim-3 dochází k zvýšené úmrtnosti buněk s Tim-3 doménou a tím inhibuje Th1 odpověď (Zhu et al., 2005). Interakce těchto dvou domén je důležitá pro nastolení periferální tolerance a prevence autoimunitních onemocnění (Sabatos et al., 2003) U myši s EAE však přidání rekombinantního Tl-gal překvapivě zhoršilo průběh EAE a vedlo ke chronicitě. V mozku byly pozorovány rozsáhlé demyelinizace a v chronické fázi docházelo k axonálnímu poškození a rozvoji astrogliózy. CNS infiltrovaly CD45R/CD220⁺ B lymfocyty a v séru bylo detekováno zvýšené množství autoreaktivních MOG specifických IgG. Ty byly patrně hlavní efektorovou molekulou zodpovědnou za rozvoj patologie. Na rozdíl od myši s EAE, kterým nebyl podán Tl-gal, zvýšily splenocyty z EAE/Tl-gal myši stimulované MOG produkci IFN- γ a TNF- α . To svědčí o silné Th1 polarizaci, což je v rozporu s předchozím pozorováním (Zhu et al. 2005). U obou skupin myši bylo ve slezině pozorováno shodné zastoupení Tregs (Bing et al., 2015).

Více helmintů s negativním účinkem na průběh EAE zatím nebylo popsáno.

4.3. Protista s pozitivním vlivem na průběh EAE

4.3.1. *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi je původce Chagasovy choroby vyskytující se v Jižní a Severní Americe. *T. cruzi* infikuje celou řadu živočichů, vektorem jsou krevsající ploštice zákeřnice (Triatominae).

Předmětem výzkumu vztahu EAE a *T. cruzi* je poměrně překvapivá úvaha, zda akutní infekce tímto parazitem skrze silnou Th1 odpověď může mít pozitivní vliv na průběh onemocnění. Výsledky studie myši s EAE nakažených *T. cruzi* totiž vykazují až kompletní remisi klinických a patologických projevů typických pro EAE (Tadokoro et al., 2004). Autoři spekulují, že makrofágy myši nakažených *T. cruzi* pod vlivem IFN- γ zvýšily produkci NO, který následně indukoval apoptózu lymfoidních buněk během infekce, a tak patrně potlačil proliferaci a expanzi autoreaktivních T lymfocytů. Stěžejním pro ústup symptomů a patologie EAE se však ukázal i IL-10, faktor potlačující produkci NO (Gazzinelli et al., 1992). Paradoxně k tomuto je však nutná přítomnost jak IL-10, tak NO pro potlačení projevů EAE vlivem infekce tohoto parazita. Výsledky této studie ukazují nejen na pozitivní změnu projevu EAE po nakažení *T. cruzi*, ale i na jeho potlačení vývoje při preimunizaci parazitem a pozdějšímu vystavení EAE antigenům.

V tomto případě se, na rozdíl od helmintů, nepotvrdil protektivní efekt antigenů *T. cruzi* (Tadokoro et al. 2004), jejichž aplikace by se nabízela namísto infekce. Tudíž lze celkem bezpečně říci, že testování tohoto parazita zůstane pouze u zvířecích modelů EAE.

4.3.2. *Toxoplasma gondii*

Již v předchozí kapitole byl naznačen možný pozitivní vliv *T. gondii* na EAE/RS. Přestože sérologická studie negativně propojila séropozitivitu *T. gondii* s roztroušenou sklerózou (Stascheit et al., 2015), žádné studie s EAE zkoumající možný protektivní mechanismus na tuto korelaci nenavazují. Tadoroko *et al.* (2004) ve své práci o *T. cruzi* sice v závěru zmiňují, že v jejich laboratoři probíhají i experimenty zabývající se podobným efektem na EAE u *T. gondii*, avšak dosud na toto téma žádné výsledky nepublikovali.

Studie na pozitivní vliv dalších protist u EAE nejsou publikovány.

4.4. Protista s negativním vlivem na průběh EAE

Studie zaměřené na negativní vliv protist u EAE nejsou publikovány.

5. Využití parazitů a jejich produktů v terapii RS

5.1. Hygienická hypotéza a hypotéza „starých přátel“

Hygienická hypotéza postulována v roce 1989, tvrdí že snížené vystavení mikroorganismům, především během dětství, v důsledku zlepšení sanitace zvyšuje reaktivitu imunitního systému vůči neškodným antigenům, což vede k rozvoji alergických a autoimunitních onemocnění (Strachan, 1989). Tento jev byl pozorován i v případě RS, jejíž incidence pozitivně koreluje s vysokou úrovní sanitace (Leibowitz et al., 1966; Fleming & Cook, 2006; Conradi et al., 2011).

V návaznosti na tuto hypotézu přišel Rook et al. (2004) s tzv. hypotézou „starých přátel“ (z angl. Old friends hypothesis), což jsou organismy, jež byly dříve obvyklou součástí našeho mikrobiomu. Odstranění těchto organismů, zahrnujících saprofytické mykobakterie, helminty a laktobacily, nás připravilo o jejich imunomodulační účinky a přispělo tak k současnému vzestupu imunitně zprostředkovaných onemocnění v západní civilizaci (Rook et al., 2004). Tyto dvě hypotézy jsou společně s imunomodulačními schopnostmi helmintů myšlenkovým východiskem aplikace helmintické terapie mj. i při RS.

5.2. Terapie RS helminty u lidí

Pro zavedení terapie helminty u lidí bylo nejdříve nutno identifikovat a vybrat parazity vhodné k terapii RS. K tomuto dopomohla částečně data z preimunizační a indukční fáze experimentů s EAE a helminty. Hlavní kritéria pro zařazení helminta jako vhodného kandidáta pro využití v helmintické terapii jsou: dostatečná znalost jeho biologie a epidemiologie, životní cyklus, který neobsahuje rozsáhlou migraci tělem hostitele (pro snížení rizika parazita v nežádoucí tkáni, kde může způsobit škody), parazit s život neohrožující patogenezi pro člověka a možnosti izolovat čistá infekční stadia pro aplikaci pacientům (Lukeš et al., 2014). Helminti, kteří se využívají v lidských testech RS, jsou v současnosti dva: prasečí *Trichuris suis* a lidský *Necator americanus*. Oba však byli nejprve u lidí použiti u jiných onemocnění: *T. suis* při léčbě zánětlivého onemocnění střev (IBD) (Weinstock et al., 2002) a *N. americanus* u astmatu (Mortimer et al., 2006). *T. suis* v těchto studiích prokázal splnění kritérií z hlediska bezpečnosti a pozitivního vlivu na pacienta s danou nemocí. *N. americanus* se na druhé straně nejeví jako ideální kandidát z hlediska bezpečnosti. Přeci jen jeho přirozená nákaza způsobuje závažné zdravotní problémy a je cílem odčervovacích programů v zemích třetího světa (Bethony et al., 2006).

5.2.1. Přirozená infekce helminty u RS

První studie věnující se vlivu přirozené infekce helmintů na RS u lidí obsahovala hned několik těchto parazitických červů (Correale & Farez, 2007). Pozorována byla kontrolní skupina 12 pacientů s relapsně-remitentní RS (RRRS) bez infekce parazity proti druhé stejně početně zastoupené skupině přirozeně nakažené helminty následovně: 3 pacienti s tasemnicí *Hymenolepis nana*, 3 pacienti s tenkohlavcem *Trichuris trichiura*, 3 pacienti se škrkavkou *Ascaris lumbricoides*, 2 pacienti s háďětem *Strongyloides stercoralis* a 1 pacient s roupem *Enterobius vermicularis*. V průběhu studie bylo u infikované skupiny pozorováno zmírnění průběhu onemocnění (nehledě na druh helminta), indikované výrazně menším počtem exacerbací a markantně menším počtem lézí oproti neinfikovaným jedincům. Pozitivní vliv

parazita na zlepšení průběhu RS nastal skrze jeho indukci T lymfocytů, které produkovaly IL-10 a TGF- β . Tyto MBP specifické T lymfocyty z infikovaných pacientů navíc nesekretovaly Th2 cytokiny IL-2 a IL-4, které se díky tomu potvrdily jako nepotřebné faktory pro iniciaci protekce vůči RS. Zaznamenáno bylo také větší množství CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T lymfocytů u infikovaných pacientů. Po dobu studie nebyly mimo symptomy RS pozorovány symptomy parazitární nákazy u infikovaných pacientů. Studie byla zajímavým východiskem pro další experimenty, nicméně její hlavní slabinou byl malý počet subjektů spolu s nezaslepeností studie a nepříliš rozsáhlým radiologickým a imunologickým hodnocením. Příkladem nepřenositelnosti výsledků ze zvířecích modelů na lidské pacienty trpící RS je srovnání se studií od La Flamme et al (2003), kde infekce *S. mansoni* neovlivnila hodnoty MOG specifického IL-10 produkovaného splenocyty.

Navazující studie o několik let později však odhalila u 4 infikovaných pacientů z předchozí studie helminty způsobené vlastní symptomy jejich infekce (Correale & Farez, 2011), konkrétně se jednalo o průjem, anémii, bolest v podbřišku, redukci váhy a s tím spojené pocity slabosti a horečku. Následně byly všechny subjekty s těmito symptomy léčeny antihelmintiky, což vedlo k vyhubení parazitů, ale zároveň ke zvýšení aktivity RS či jejímu navrácení. Zhoršení klinických příznaků bylo asociováno se snížením IL-10 a TGF- β a zvýšením IL-12 a IFN- γ produkce z periferních krevních monocytů (PMBC) stimulovanými MBP. Po 3 měsících od podání antihelmintik došlo u pacientů také k poklesu hladiny CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T lymfocytů (Correale & Farez, 2011). Zhoršení RS, u již neinfikovaných pacientů díky podání antihelmintik, podpořilo závěry o protektivním vlivu helmintů na RS z předcházející studie, ovšem otevřelo také otázku bezpečnosti helmintické terapie.

Další studie z repertoáru téhož týmu popisuje asociaci helmintem indukovaných B lymfocytů se zlepšením stavu RS pacientů (Correale & Farez, 2008). Zde bylo pozorováno 12 RS pacientů nakažených helminty z předchozí studie (Correale & Farez, 2007), 10 RS pacientů nakažených *T. cruzi* a 8 RS pacientů infikovaných houbou *Paracoccidioides brasiliensis*. Jako kontrola zde sloužila skupina 10 zdravých subjektů a 12 pacientů s RS bez infekce. B lymfocyty stimulované helminty u infikovaných pacientů produkovaly velké množství IL-10, a neurotrofického faktoru NGF a na jejich povrchu bylo současně pozorováno více CD1d jednotek. Autoři spekulují, že právě zvýšená produkce IL-10 a NGF helminty indukovaných B lymfocytů vedly ke zlepšení průběhu a zamezení postupu RS.

Naproti tomu u pacientů infikovaných *T. cruzi* nebyl protektivní efekt, pozorovaný ve zvířecím modelu (Correale & Farez, 2008), potvrzen. Nižší množství IL-10 v krevním séru naznačuje

nepřítomnost protektivní role *T. cruzi* u lidských pacientů. Navíc hodnoty zánětlivého cytokinu TNF- α u pacientů infikovaných *T. cruzi* byly dokonce o něco vyšší než u kontrol. Jde tedy o další příklad pro nepřenositelnost výsledků ze zvířecích modelů k lidským.

U pacientů s RS přirozeně infikovaných helminty byly pozorovány některé imunologické procesy, skrze které výše uvedení helminti zlepšují stav pacientů s RS. Působení těchto různých helmintů iniciovalo nárůst počtu Treg, stimulovalo imunitní odpověď k protizánětlivému Th2 fenotypu spolu s tím stimulovalo i zvýšenou produkci IL-10 a TGF- β . Současně jsou helminti schopni potlačit zánětlivou Th1 odpověď skrze potlačení produkce IFN- γ a IL-12. Mimo ovlivnění populací T lymfocytů jsou i na základě pozorování schopni ovlivnit B lymfocyty, které vlivem parazitů produkují větší množství NGF a IL-10. Ve výsledku lze říci, že přirozená infekce helminty prokazatelně zlepšuje stav pacientů s RS a ovlivňuje hostitelskou imunitu komplexně, přes celou řadu regulačních mechanismů (Correale & Farez, 2007; Correale & Farez, 2008; Correale & Farez, 2009; Correale & Farez, 2011). Přestože se výsledky přirozeně se vyskytujícími infekcemi helminty zdají optimistické, nesmí být brány bez zdrženlivosti. Přeci jen tyto studie nebyly slepé, byl zde pouze malý počet subjektů a infekce skrze přirozeně se vyskytující a v klinických testech dále nevyužitých helmintů, kteří představují potenciální hazard pro pacienta.

5.2.2. Klinické testy terapie RS helminty

Po relativně příznivých výsledcích ze studií s přirozenou nákazou helminty přišly první klinické studie s řízenou infekcí RS pacientů helminty. První z nich byla tzv. helmintem indukovaná imunomodulační terapie (HINT z angl. helminth-induced immunomodulation therapy), při níž byla 5 pacientům s RRRS po dobu 3 měsíců podávána vajíčka *T. suis* (TSO, z angl. *T. suis* ova) (NCT00645749, 2008; Fleming et al., 2011). Během léčby byl pozorován menší počet lézí (pokles z 6,6 na 2,0) a zvýšená koncentrace IL-10 a IL-4 v séru naznačující polarizaci k Th2 odpovědi. Po 2 měsících od ukončení podávání TSO byl pozorován nárůst počtu lézí blížící se číslu před léčbou (5,8). Oproti zvířecím modelům zde však nebyla zjištěna přítomnost AAM. Také zde došlo k nástupu slabých gastrointestinálních symptomů u 3 z 5 subjektů vlivem první administrace TSO u pacientů, kteří se s tímto parazitem ještě nesetkali. Proti již výše uváděné studii (Correale & Farez, 2007) však tyto symptomy byly pouze mírné a došlo k jejich samovolnému vymizení okolo 30 dpi. Kromě rizika rozvoje klinických příznaků parazitární infekce, byl limitem této pilotní studie velice nízký počet probandů, a tedy výrazně omezená možnost zobecnit získané výsledky.

Při počáteční kolonizaci *T. suis* byla pozorována silnější systémová imunitní odpověď (zvýšená hladina eozinofilů a protilátek IgG1 a IgA vůči parazitovi). Postupem času však odezněla a byl pozorován protektivní vliv parazita vůči RS. V návaznosti na tuto první HINT 1 studii byla spuštěna fáze 2 klinických testů HINT 2 (NCT00645749, 2008, Fleming et al., 2017). V této fázi bylo 16 RRRS subjektům podáváno TSO po dobu 10 měsíců. Výsledky této studie však nebyly uspokojivé dle optimistických očekávání. Stav pacientů se zlepšil pouze u 12 subjektů z 16. Navíc efektivita léčby TSO se různila u jednotlivých pacientů a celkové snížení počtu aktivních lézí dosahovalo pouhých 35 %. Na druhou stranu bylo pozitivem potvrzení bezpečnosti administrace TSO (tzn. u žádného pacienta se neobjevily gastrointestinální obtíže) u RRRS pacientů a přítomnost helmintem indukované vyšší koncentrace Treg.

Ne všechny studie s využitím TSO však prokazují ve výsledcích příznivý vliv parazita na pacienta s RRRS (NCT01006941, 2009, Voldsgaard et al., 2015). Další studie tzv. terapie vajíčky *Trichuris suis* pro relapsivní roztroušenou sklerózu TRIMS A (z angl. *Trichuris suis* ova therapy for relapsing multiple sclerosis) sledovala 10 RRRS pacientů léčených TSO po dobu 3 měsíců. Šest z nich však bylo současně léčeno IFN- β proti RS. Žádné imunologické, MRI (magnetická rezonance) a klinické pozorované znaky naznačující zlepšení stavu RS pacienta nebyly pozorovány. Překvapivě žádné výsledky vlivu *T. suis* oproti předchozím studiím zde nejsou zdůvodněny. Opět však zde, jako u předcházejících studií, byla potvrzena bezpečnost léčby TSO u RRRS pacienta. I v tomto případě je však nutné mít na zřeteli nízký počet zapojených pacientů.

RRRS není jediným subtypem RS zahrnutým do klinických testů s helminty. Dalším tímto subtypem v klinických testech se stala sekundárně progresivní roztroušená skleróza (SPRS) (Benzel et al., 2012). Čtyřem SPRS pacientům bylo podáváno TSO po dobu 6 měsíců. Pozorování zvýšené koncentrace IL-2 spolu s dočasným zvýšením koncentrace IL-4 ukázalo na zmírnění Th1 odpovědi, která byla při počátku infekce dominantní, a naopak dočasné zesílení Th2 odpovědi. Další pozorování hladin eozinofilů a T lymfocytů, které byly nižší, vedlo k popsání spíše mírného protektivního účinku TSO vůči RS.

Stejný výzkumný tým pokračoval ve studiu této problematiky dále v početně rozsáhlejší studii zahrnující 50 subjektů s názvem TRIOMS (z angl. *Trichuris suis* ova in recurrent remittent multiple sclerosis and clinically isolated syndrome) tzv. vajíčka *Trichuris suis* u relaps-remitentní roztroušené sklerózy a klinicky izolovaného syndromu (NCT01413243, 2011, Rosche et al., 2013). Pacienti v této studii však byli oproti předcházející studii s relaps-remitentní RS nebo s klinicky izolovaným syndromem (CIS) a bylo jim podáváno TSO nebo

placebo po dobu 12 měsíců. Očekávána byla změna z Th1 a Th17 na Th2 protizánětlivý fenotyp imunitní odpovědi. Tato studie však byla před svým dokončením předčasně ukončena (Rosche et al., 2013).

Studii, která se již nezabývá vlivem *T. suis*, nýbrž vlivem larev *N. americanus* na RS je WIRMS (z angl. worms for immune regulation of MS) neboli „červi pro imunitní regulaci RS“ (NCT01470521, 2011). Výhodou této studie oproti předchozím byl jednak vyšší počet probandů (72 subjektů, 72 s RRRS), jednak dvojitá zaslepenost této studie (tedy ani lékaři, ani pacienti nevěděli, komu je podáván helmint či placebo). Tato studie měla dle záznamu v databázi ClinicalTrials.gov zevrubně prozkoumat regulační síť zahrnující Treg a Breg lymfocyty, Tr1 a NK buňky. Přestože je studie již dokončena (dokončení v roce 2016) její výsledky zatím nebyly publikovány (NCT01470521, 2011).

V současnosti se tedy v klinických testech využívají pouze 2 helminti, a to *T. suis* a *N. americanus* (Helmby, 2015). Nákaza *T. suis* však trvá poměrně krátkou dobu, tudíž se podávání TSO musí opakovat pro pozitivní vliv na onemocnění. Krátká doba infekce je na druhou stranu i výhodou pro neschopnost parazita způsobovat chronické infekce, které mohou způsobovat gastrointestinální obtíže. Larvy *N. americanus* migrují tělem a způsobují naopak dlouhotrvající infekce (Jourdan et al., 2018), tudíž větší dávka tohoto parazita představuje pro člověka riziko. Opatrnost je tedy při cílené manipulaci s helminty u lidí na místě. Terapie pomocí helmintů by měla být aplikována pouze ve výzkumníky nebo lékaři monitorovaných testech, kde lze případně předcházet či potlačit nežádoucí vedlejší účinky těchto parazitů a eliminovat tím tak riziko zhoršení stavu pacienta.

Závěrem vyplývá, že klinické testy na vliv helmintů u pacientů s RS nejsou ještě zdaleka u konce. I přes slibné výsledky je třeba studie provést na větším vzorku pacientů. Nutná je i lepší charakteristika imunitních mechanismů, které způsobují zmírnění projevů tohoto onemocnění. Další studie na toto téma jsou žádoucí.

Přestože předmětem této práce není zabývat se vlivem helmintů na změny střevního mikrobiomu, je důležité toto téma alespoň zmínit, neboť v současné době začíná být i oproti imunologickému vyšetřování vlivu helmintů kladen důraz na examinaci jejich působení na střevní mikrobiom u RS. Právě změny složení střevního mikrobiomu vlivem helmintů jsou považovány za možného přispěvatele ke zlepšení klinických projevů nemoci u pacientů s RS vlivem infekce helmintů (Correale & Farez, 2011). K tomuto tématu však doposud chybí data zkoumající tento jev u RS rozsáhleji.

5.2.3 Produkty helmintů využité v terapii RS

Potenciální zapojení molekul z helmintů oproti nákaze živým parazitem může být pro mnohé preferovanější ať už z hlediska omezení patogeneze parazita či eliminace nepříjemného pocitu pacienta.

Vhodným kandidátem pro klinické testování by se mohly zdát SEA *S. mansoni*, jež jsou dosud jediným parazitární produktem testovaným na buňkách pacientů s RS. Po jejich aplikaci došlo k modulaci aktivity DC a u B lymfocytů k supresi produkce IL-12 a iniciaci produkce IL-10 (Correale & Farez, 2009). Žádné zaregistrované klinické studie se SEA však u RS pacientů dosud neprobíhají.

Další produkty helmintů uvedené již v předchozí kapitole u jejich vlivu na EAE nejsou zatím používány jako nástroj terapie. U lidské RS zatím nejsou publikované a ani uvedené v databázi klinických testů studie na využití ES helmintů u pacientů s RS ať už v rekrutovací fázi či právě probíhající.

6. Závěr

Zkoumané parazitární infekce se nepotvrdily jako původci RS. Přestože protozoární infekce parazity *T. gondii* a *A. castellanii* jsou schopny vyvolat zánět v CNS, v některých aspektech podobný tomu u RS. Pravděpodobné vysvětlení u *T. gondii* je pouhá podobnost takto vyvolaného zánětu s RS a nikoliv její spouštěcí role v tomto onemocnění. Na základě těchto pozorování nebyl u lidí žádný parazit potvrzený jako spouštěč tohoto onemocnění, ale u *A. castellanii* byl potvrzen zánět, evokující značnou podobnost s RS, který by měl být rozhodně podroben zevrubnějšímu prozkoumání u lidí. Naopak infekce *T. gondii* začíná být v poslední době negativně korelována s výskytem RS a začíná být studována její možná protektivní role.

Data získaná ze zvířecího modelu RS (EAE) nám přinášejí cenné poznatky ohledně mechanismů patologie a zapojených imunitních buněk v průběhu tohoto onemocnění. Navíc modely se současnou infekcí vybranými parazity u subjektů s EAE, během kterých dochází vlivem parazitů ke zmírnění projevů až kompletního vymizení EAE, nám přinášejí vhled do nestejných mechanismů protekce indukovaných u jednotlivých parazitů. Zvířecí modely dále ukázaly, že u některých parazitů se imunomodulační vlastnosti liší u jejich různých stádií. U *H. polygyrus* mají tyto vlastnosti nejen larvální stádia, ale i dospělci. Oproti tomu u *S. mansoni* mají žádoucí imunomodulační vlastnosti pouze vajíčka. Navíc pouze při infekci *H. polygyrus* dochází k vymizení onemocnění i při infekci parazitem v efektorové fázi. Ostatní v práci uvedení parazité jsou schopni ochrany před onemocněním pouze při infekci v preindukční či indukční fázi EAE, což může značit problém u případných lidských klinických testů. V kontrastu k uvedeným popsáním ochranným vlivům parazitů u EAE je nutno neopomenout problematiku využití získaných poznatků při jejich přenosu od zvířecích modelů k pacientům. Některé očekávané protektivní mechanismy působení helmintů na zánět popsané u EAE (např. neovlivnění hodnot IL-10 u infekce *S. mansoni* u EAE) nebyly u pacientů s RS pozorovány. Zvířecí modely s EAE a infekcí parazity tedy přinesly důležité poznatky o roli parazity indukované imunomodulace na průběh onemocnění, avšak jejich přenesení do lidské RS a její terapie je prozatím spíše omezené a v počátcích.

V posledních letech byly ukončeny první klinické studie zabývající se úspěšností, ale také bezpečností helmintické terapie u lidí s RS. Tři ze čtyř studií prokázaly pozitivní vliv aplikace vajíček hlístice *T. suis* na zmírnění projevů RS. Limitem těchto studií je však omezený počet probandů, na nichž byla terapie testována. Některé studie také zpochybnilly její bezpečnost, jelikož se u probandů vyskytly obtíže související s parazitární infekcí. Další překážku

představuje využití této terapie u imunokompromitovaných jedinců, kde nákaza živým parazitem může místo zlepšení prognózy způsobit zhoršení stavu pacienta vlivem infekce. Tudíž opatrnost a důslednost při terapii RS helminty je na místě. I přes to se vajíčka *T. suis* zdají být prozatím vhodným kandidátem pro další klinické testování.

Potenciální bezpečností rizika spojená s aplikací živých parazitů by mohlo vyřešit podávání jejich produktů s imunomodulační funkcí. U zvířecích modelů tyto produkty zmírňovaly průběh onemocnění a nabízí se tak využít je jako alternativu k infekci živým helmintem. Zatím však nebyla identifikována konkrétní molekula zodpovědná za žádoucí imunomodulační účinky těchto směsných produktů při EAE/RS. Nalezení takové molekuly by umožnilo její výrobu a klinické testování. Vyřešily by se tím problémy spojené s velikostí infekční dávky, neregulovatelností infekce a její mlžné patogenity v případě použití živého helminta, nehledě na pravděpodobně lepší přijetí takové terapie ze strany pacientů.

Seznam použité literatury:

Sekundární zdroje jsou označeny hvězdičkou (*).

- *Akuthota, P., Wang, H. B., Spencer, L. A., & Weller, P. F. (2008). Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(8), 1254–1263.
- *Althaus, H. H. (2004). Remyelination in multiple sclerosis: a new role for neurotrophins? *Progress in Brain Research*, 146, 415–432.
- Anderson, A. C., Chandwaskar, R., Lee, D. H., Sullivan, J. M., Solomon, A., Rodriguez-Manzanet, R., Greve, B., Sobel R. A., Kuchroo, V. K. (2012). A transgenic model of central nervous system autoimmunity mediated by CD4+ and CD8+ T and B cells. *Journal of Immunology*, 188(5), 2084–2092.
- *Ascherio, A., & Munger, K. L. (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Annals of Neurology*, 61(4), 288–299.
- Barr, T. A., Shen, P., Brown, S., Lampropoulou, V., Roch, T., Lawrie, S., Fan, B., O'Connor R. A., Anderton, S. M., Bar-Or, A., Filatreau, S., Gray, D. (2012). B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(5), 1001–1010.
- Benzel, F., Erdur, H., Kohler, S., Frentsch, M., Thiel, A., Harms, L., Wandinger, K. P., Rosche, B. (2012). Immune monitoring of Trichuris suis egg therapy in multiple sclerosis patients. *Journal of Helminthology*, 86(03), 339–347.
- *Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S. M., Loukas, A., Diemert, D., & Hotez, P. J. (2006). Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *The Lancet*, 367(9521), 1521–1532.
- Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H. L., Linington, C., Sobel, R. A., & Kuchroo, V. K. (2003). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(9), 1073–1081.
- Bing, S. J., Ha, D., Ahn, G., Cho, J., Kim, A., Park, S. K., Yu, H.S., Jee, Y. (2015). Galectin isolated from parasite inhibits remission of experimental autoimmune encephalomyelitis by up-regulating autoantibody. *Clinical & Experimental Immunology*, 180(3), 419–431.
- Biswas, K., Chatterjee, D., Addya, S., Khan, R. S., Kenyon, L. C., Choe, A., Cohrs, R. J., Shindler, K. S., Das Sarma, J. (2016). Demyelinating strain of mouse hepatitis virus infection bridging innate and adaptive immune response in the induction of demyelination. *Clinical Immunology*, 170, 9–19.
- * Blakemore, W. F., & Franklin, R. J. M. (2008). Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. In *Advances in multiple Sclerosis and Experimental Demyelinating Diseases*, 318, 193–212.
- *Blanchard, N., Dunay, I. R., & Schlüter, D. (2015). Persistence of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system: a fine-tuned balance between the parasite, the brain and the immune system. *Parasite Immunology*, 37(3), 150–158.
- Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B. V., & Thompson,

- A. J. (2014). Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*, 83(11), 1022–1024.
- Bsibsi, M., Peferoen, L. A. N., Holtman, I. R., Nacken, P. J., Gerritsen, W. H., Witte, M. E., van horsen, J., Eggen, B. J., van der valk, P., van Noort, J. M. (2014). Demyelination during multiple sclerosis is associated with combined activation of microglia/macrophages by IFN- γ and alpha B-crystallin. *Acta Neuropathologica*, 128(2), 215–229.
- Chitnis, T., Najafian, N., Benou, C., Salama, A. D., Grusby, M. J., Sayegh, M. H., & Khoury, S. J. (2001). Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of clinical investigation*, 108(5), 739–747.
- Confavreux, C., Vukusic, S., & Adeleine, P. (2003). Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain: A Journal of Neurology*, 126(Pt 4), 770–782.
- Conradi, S., Malzahn, U., Schröter, F., Paul, F., Quill, S., Spruth, E., Harms, E., Then Bergh, F., Ditzelbach, A., Georgi, T., Heuschmann, P., Rosche, B. (2011). Environmental factors in early childhood are associated with multiple sclerosis: a case-control study. *BMC Neurology*, 11, 123.
- Correale, J., & Farez, M. (2007). Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 61(2), 97–108.
- Correale, J., Farez, M., & Razzitte, G. (2008). Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Annals of Neurology*, 64(2), 187–199.
- Correale, J., Farez, M., & Warren, K. S. (2009). Helminth antigens modulate immune responses in cells from multiple sclerosis patients through TLR2-dependent mechanisms. *Journal of Immunology*, 183(9), 5999–6012.
- Correale, J., & Farez, M. F. (2011). The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 233(1–2), 6–11.
- *Correale, J., & Gaitán, M. I. (2015). Multiple sclerosis and environmental factors: the role of vitamin D, parasites, and Epstein-Barr virus infection. *Acta Neurologica Scandinavica*, 132, 46–55.
- *Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), 545–558.
- Donskow-Łysoniewska, K., Krawczak, K., & Doligalska, M. (2012). Heligmosomoides polygyrus: EAE remission is correlated with different systemic cytokine profiles provoked by L4 and adult nematodes. *Experimental Parasitology*, 132(2), 243–248.
- Donskow-Łysoniewska, K., Krawczak, K., Bocian, K., & Doligalska, M. (2018). The Effects of Intestinal Nematode L4 Stage on Mouse Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 66(3), 231–243.
- Enriquez-Marulanda, A., Valderrama-Chaparro, J., Parrado, L., Diego Vélez, J., Maria Granados, A., Luis Orozco, J., & Quiñones, J. (2017). Cerebral toxoplasmosis in an MS patient receiving Fingolimod. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 18, 106–108.
- Finlay, C. M., Stefanska, A. M., Walsh, K. P., Kelly, P. J., Boon, L., Lavelle, E. C., Walsh, P. E., Mills, K. H. G. (2016). Helminth Products Protect against Autoimmunity via Innate

- Type 2 Cytokines IL-5 and IL-33, Which Promote Eosinophilia. *The Journal of Immunology*, 196(2), 703–714.
- Flegr, J., & Escudero, D. Q. (2016). Impaired health status and increased incidence of diseases in Toxoplasma-seropositive subjects – an explorative cross-sectional study. *Parasitology*, 143(14), 1974–1989.
- Fleming, J., & Cook, T. D. (2006). Multiple sclerosis and the hygiene hypothesis. *Neurology*, 67(11), 2085–2086.
- Fleming, J., Isaak, A., Lee, J. E., Luzzio, C. C., Carrithers, M. D., Cook, T. D., Field, A. S., Boland, J., Fabry, Z. (2011). Probiotic helminth administration in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 1 study. *Multiple Sclerosis Journal*, 17(6), 743–754.
- Fleming, J., Hernandez, G., Hartman, L., Maksimovic, J., Nace, S., Lawler, B., Risa, T., Cook, T., Agni, R., Reichelderfer, M., Luzzio, C., Rolak, L., Field, A., Fabry, Z. (2017). Safety and efficacy of helminth treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis: Results of the HINT 2 clinical trial. *Multiple Sclerosis Journal*, 135245851773637.
- *Friese, M. A., Schattling, B., & Fugger, L. (2014). Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 10(4), 225–238.
- Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., Hieny, S., James, S. L., & Sher, A. (1992). The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *European Journal of Immunology*, 22(10), 2501–2506.
- Gruden-Movsesijan, A., Ilic, N., Mostarica-Stojkovic, M., Stosic-Grujicic, S., Milic, M., & Sofronic-Milosavljevic, L. (2008). *Trichinella spiralis*: Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats. *Experimental Parasitology*, 118(4), 641–647.
- Gruden-Movsesijan, A., Ilic, N., Mostarica-Stojkovic, M., Stosic-Grujicic, S., Milic, M., & Sofronic-Milosavljevic, L. (2010). Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic *Trichinella spiralis* infection in Dark Agouti rats. *Parasite Immunology*, 32(6), 450–459.
- Havrdová E. Roztroušená skleróza. 2. vydání. Praha, Triton, 2000.
- *Helmby, H. (2015). Human helminth therapy to treat inflammatory disorders - where do we stand? *BMC Immunology*, 16, 12.
- *Hill, D. E., Chirukandoth, S., & Dubey, J. P. (2005). Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews*, 6(01), 41–61.
- Hogeboom, C. (2015). Peptide motif analysis predicts lymphocytic choriomeningitis virus as trigger for multiple sclerosis. *Molecular Immunology*, 67(2), 625–635.
- *Hogestyn, J., Mock, D., & Mayer-Proschel, M. (2018). Contributions of neurotropic human herpesviruses herpes simplex virus 1 and human herpesvirus 6 to neurodegenerative disease pathology. *Neural Regeneration Research*, 13(2), 211.
- Ji, Q., Perchellet, A., & Goverman, J. M. (2010). Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8⁺ T cells expressing dual TCRs. *Nature Immunology*, 11(7), 628–634.
- *Jourdan, P. M., Lamberton, P. H. L., Fenwick, A., & Addiss, D. G. (2018). Soil-transmitted

- helminth infections. *The Lancet*, 391(10117), 252–265.
- Kabat, E. A., Wolf, A., & Bezer, A. E. (1947). The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *The Journal of Experimental Medicine*, 85(1), 117–130.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature Medicine*, 13(10), 1173–1175.
- Koskderelioglu, A., Afsar, I., Pektas, B., & Gedizlioglu, M. (2017). Is *Toxoplasma gondii* infection protective against multiple sclerosis risk? *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 15, 7–10.
- Kuijk, L. M., Klaver, E. J., Kooij, G., van der Pol, S. M. A., Heijnen, P., Bruijns, S. C., Kringel, H., Pinelli, E., Kraal, G., de Vries, H. E., Dijkstra, C. D., Bouma, G., van Die, I. (2012). Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation. *Molecular Immunology*, 51(2), 210–218.
- Kurtzke, J. F. (2000). Multiple sclerosis in time and space--geographic clues to cause. *Journal of Neurovirology*, 6(2), 134–140.
- Kuusisto, H., Kaprio, J., Kinnunen, E., Luukkaala, T., Koskenvuo, M., & Elovaara, I. (2008). Concordance and heritability of multiple sclerosis in Finland: study on a nationwide series of twins. *European Journal of Neurology*, 15(10), 1106–1110.
- La Flamme, A. C., Ruddenklau, K., & Bäckström, B. T. (2003). Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infection and Immunity*, 71(9), 4996–5004.
- Leibowitz, U., Antonovsky, A., Medalie, J. M., Smith, H. A., Halpern, L., & Alter, M. (1966). Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 29(1), 60–68.
- Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Sørensen, P. S., Thompson, A. J., Wolinsky, J. S., Balcer, L. J., Bandwell, B., Barkhof, F., Bebo, B. Jr., Calabresi, P. A., Clanet, M., Comi, G., Fox, R. J., Freedman, M. S., Goodman A. D., Inglese, M., Kappos, L., Kieseier, B.C., Lincoln, J. A., Lubetzky, C., Miller, A. E., Montalban, X., O'Connor, P. W., Petkau, J., Pozzilli, C., Rudick, R. A., Sormani, M. P., Stüve, O., Waubant, E., Polman, C. H. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*, 83(3), 278–286.
- *Lukeš, J., Kuchta, R., Scholz, T., & Pomajbíková, K. (2014). (Self-) infections with parasites: re-interpretations for the present. *Trends in Parasitology*, 30(8), 377–385.
- Lund, M. E., Greer, J., Dixit, A., Alvarado, R., McCauley-Winter, P., To, J., Tanaka, A., Hutchinson, A. T., Robinson, M. W., Simpson, A. M., O'Brien, B. A., Dalton, J. P., Donnelly, S. (2016). A parasite-derived 68-mer peptide ameliorates autoimmune disease in murine models of Type 1 diabetes and multiple sclerosis. *Scientific Reports*, 6, 37789.
- *Maizels, R. M., & McSorley, H. J. (2016). Regulation of the host immune system by helminth parasites. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(3), 666–675.

- *Marrie, R. A. (2004). Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *The Lancet. Neurology*, 3(12), 709–718.
- Massilamany, C., Asojo, O. A., Gangaplara, A., Steffen, D., & Reddy, J. (2011b). Identification of a second mimicry epitope from *Acanthamoeba castellanii* that induces CNS autoimmunity by generating cross-reactive T cells for MBP 89-101 in SJL mice. *International Immunology*, 23(12), 729–739.
- Massilamany, C., Marciano-Cabral, F., Rocha-Azevedo, B. da, Jamerson, M., Gangaplara, A., Steffen, D., Zabad, R., Illes, Z., Sobel, R. A., Reddy, J. (2014). SJL mice infected with *Acanthamoeba castellanii* develop central nervous system autoimmunity through the generation of cross-reactive T cells for myelin antigens. *PloS One*, 9(5), e98506.
- Massilamany, C., Thulasingham, S., Steffen, D., & Reddy, J. (2011a). Gender differences in CNS autoimmunity induced by mimicry epitope for PLP 139–151 in SJL mice. *Journal of Neuroimmunology*, 230(1–2), 95–104.
- Massilamany, C., Steffen, D., & Reddy, J. (2010). An epitope from *Acanthamoeba castellanii* that cross-react with proteolipid protein 139-151-reactive T cells induces autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. *Journal of Neuroimmunology*, 219(1–2), 17–24.
- McRae, B. L., Kennedy, M. K., Tan, L. J., Dal Canto, M. C., Picha, K. S., & Miller, S. D. (1992). Induction of active and adoptive relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) using an encephalitogenic epitope of proteolipid protein. *Journal of Neuroimmunology*, 38(3), 229–240.
- *McSorley, H. J., & Maizels, R. M. (2012). Helminth infections and host immune regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 585–608.
- Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N., & Ben-Nun, A. (1995). A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol*, 25(7), 1951–1959.
- *Mentis, A.-F. A., Dardiotis, E., Grigoriadis, N., Petinaki, E., & Hadjigeorgiou, G. M. (2017). Viruses and endogenous retroviruses in multiple sclerosis: From correlation to causation. *Acta Neurologica Scandinavica*, 136(6), 606–616.
- *Mix, E., Meyer-Rienecker, H., Hartung, H. P., & Zettl, U. K. (2010). Animal models of multiple sclerosis—potentials and limitations. *Progress in neurobiology*, 92(3), 386–404
- *Montoya, J. G., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet (London, England)*, 363(9425), 1965–1976.
- Mortimer, K., Brown, A., Feary, J., Jagger, C., Lewis, S., Antoniak, M., Pritchard, D., Britton, J. (2006). Dose-ranging study for trials of therapeutic infection with *Necator americanus* in humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(5), 914–920.
- Mosca, L., Mantero, V., Penco, S., La Mantia, L., De Benedetti, S., Marazzi, M. R., Spreafico, C., Erminio, C., Grassi, L., Lando, G., Zagaria, M., Agostoni, E., Protti, A. (2017). HLA-DRB1*15 association with multiple sclerosis is confirmed in a multigenerational Italian family. *Functional Neurology*, 32(2), 83–88.
- Njenga, M. K., Marques, C., & Rodriguez, M. (2004). The role of cellular immune response in Theiler's virus-induced central nervous system demyelination. In *Journal of*

Neuroimmunology, 147 (1-2), 73–77.

- Orton, S.-M., Herrera, B. M., Yee, I. M., Valdar, W., Ramagopalan, S. V., Sadovnick, A. D., Ebers, G. C., Canadian Collaborative Study Group. (2006). Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *The Lancet. Neurology*, 5(11), 932–936.
- Ota, K., Matsui, M., Milford, E. L., Mackin, G. A., Weiner, H. L., & Hafler, D. A. (1990). T-cell recognition of an immuno-dominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature*, 346(6280), 183–187.
- Parratt, J., Tavendale, R., O’Riordan, J., Parratt, D., & Swingler, R. (2008). Chlamydia pneumoniae-specific serum immune complexes in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis journal*, 14(3), 292-299.
- Patsopoulos, N. A., Barcellos, L. F., Hintzen, R. Q., Schaefer, C., van Duijn, C. M., Noble, J. A., Raj, T., IMSGC, ANZgene, Gourraud, P. A., Stranger, B. E., Oksenberg, J., Olsson, T., Taylor, B. V., Sawcer, S., Hafler, D. A., Carrington, M., De Jager, P. L., de Bakker, P. I. W. (2013). Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genetics*, 9(11), e1003926.
- Peón, A. N., Ledesma-Soto, Y., Olguín, J. E., Bautista-Donis, M., Sciutto, E., & Terrazas, L. I. (2017). Helminth Products Potently Modulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Downregulating Neuroinflammation and Promoting a Suppressive Microenvironment. *Mediators of Inflammation*, 1-16.
- *Procaccini, C., De Rosa, V., Pucino, V., Formisano, L., & Matarese, G. (2015). Animal models of Multiple Sclerosis. *European Journal of Pharmacology*, 759, 182–191.
- Radovic, I., Gruden-Movsesijan, A., Ilic, N., Cvetkovic, J., Mojsilovic, S., Devic, M., & Sofronic-Milosavljevic, L. (2015). Immunomodulatory effects of *Trichinella spiralis*-derived excretory–secretory antigens. *Immunologic Research*, 61(3), 312–325.
- Ransohoff, R. M. (2012). Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nature Neuroscience*, 15(8), 1074–1077.
- Reyes, J. L., Espinoza-Jiménez, A. F., González, M. I., Verdin, L., & Terrazas, L. I. (2011). *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cellular Immunology*, 267, 77–87.
- Rook, G. A. W., Adams, V., Palmer, R., Brunet, L. R., Hunt, J., & Martinelli, R. (2004). Mycobacteria and other environmental organisms as immunomodulators for immunoregulatory disorders. *Springer Seminars in Immunopathology*, 25(3–4), 237–255.
- Rosche, B., Wernecke, K.-D., Ohlraun, S., Dörr, J.-M., & Paul, F. (2013). *Trichuris suis* ova in relapsing-remitting multiple sclerosis and clinically isolated syndrome (TRIOMS): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 14(1), 112.
- Sabatos, C. A., Chakravarti, S., Cha, E., Schubart, A., Sánchez-Fueyo, A., Zheng, X. X., Coyle, A. J., Strom, T. B., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K. (2003). Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nature Immunology*, 4(11), 1102–1110.
- Salama, A. D., Chitnis, T., Imitola, J., Ansari, M. J. I., Akiba, H., Tushima, F., Azuma, M., Yagita, H., Sayegh M. H., Khoury, S. J. (2003). Critical Role of the Programmed Death-1 (PD-1) Pathway in Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The*

Journal of Experimental Medicine, 198(1), 71–78.

- *Schwartz, M., & Baruch, K. (2014). The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *The EMBO Journal*, 33(1), 7–22.
- Sewell, D., Qing, Z., Reinke, E., Elliot, D., Weinstock, J., Sandor, M., & Fabry, Z. (2003). Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *International Immunology*, 15(1), 59–69.
- Silva, N. M., Manzan, R. M., Carneiro, W. P., Milanezi, C. M., Silva, J. S., Ferro, E. A. V., & Mineo, J. R. (2010). Toxoplasma gondii: The severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood–brain barrier permeability. *Experimental Parasitology*, 126(2), 167–177.
- Sofronic-Milosavljevic, L. J., Radovic, I., Ilic, N., Majstorovic, I., Cvetkovic, J., & Gruden-Movsesijan, A. (2013). Application of dendritic cells stimulated with Trichinella spiralis excretory-secretory antigens alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Medical Microbiology and Immunology*, 202(3), 239–249.
- Sotgiu, S., Angius, A., Embry, A., Rosati, G., & Musumeci, S. (2008). Hygiene hypothesis: Innate immunity, malaria and multiple sclerosis. *Medical Hypotheses*, 70(4), 819–825.
- Stascheit, F., Paul, F., Harms, L., & Rosche, B. (2015). Toxoplasma gondii seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 285, 119–124.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., & Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(1), 287–292.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 299(6710), 1259–1260.
- Tadokoro, C. E., Vallochi, A. L., Rios, L. S., Martins, G. A., Schlesinger, D., Mosca, T., Kuchroo, V. K., Rizzo, L. V., Abrahamsohn, I. A. (2004). Experimental autoimmune encephalomyelitis can be prevented and cured by infection with Trypanosoma cruzi. *Journal of Autoimmunity*, 23(2), 103–115.
- Terrazas, C., de Dios Ruiz-Rosado, J., Amici, S. A., Jablonski, K. A., Martinez-Saucedo, D., Webb, L. M., Cortado, H., Robledo-Avila, F., Oghumu, S., Satoskar, A. R., Rodriguez-Sosa, M., Terrazas, L. I., Guerau-de-Arellano, M., Partida-Sánchez, S. (2017). Helminth-induced Ly6Chi monocyte-derived alternatively activated macrophages suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scientific Reports*, 7, 40814.
- Vandebriel, R. J., Meredith, C., Scott, M. P., van Dijk, M., & van Loveren, H. (2000). Interleukin-10 is an unequivocal Th2 parameter in the rat, whereas interleukin-4 is not. *Scandinavian Journal of Immunology*, 52(5), 519–524.
- van der Mei, I. A. F., Ponsonby, A.-L., Dwyer, T., Blizzard, L., Simmons, R., Taylor, B. V., Butzkueven, H., Kilpatrick, T. (2003). Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. *BMJ*, 327(7410), 316.
- Varga, E., Pandur, E., Abrahám, H., Horváth, A., Ács, P., Komoly, S., Miseta, A., Sipos, K. (2018). Cuprizone Administration Alters the Iron Metabolism in the Mouse Model of

Multiple Sclerosis. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1–17.

- Voldsgaard, A., Bager, P., Garde, E., Åkeson, P., Leffers, A., Madsen, C. G., Kapel, C., Roepstorff, A., Thamsborg, S. M., Melbye, M., Siebner, H., Søndergaard, H. B., Sørensen, P. S. (2015). *Trichuris suis* ova therapy in relapsing multiple sclerosis is safe but without signals of beneficial effect. *Multiple Sclerosis Journal*, 21(13), 1723–1729.
- Walsh, K. P., Brady, M. T., Finlay, C. M., Boon, L., & Mills, K. H. G. (2009). Infection with a Helminth Parasite Attenuates Autoimmunity through TGF- β -Mediated Suppression of Th17 and Th1 Responses. *The Journal of Immunology*, 183(3), 1577–1586.
- *Weinstock, J. V., Summers, R. W., Elliott, D. E., Qadir, K., Urban, J. F., & Thompson, R. (2002). The possible link between de-worming and the emergence of immunological disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139(6), 334–338.
- Wilson, M. S., Taylor, M. D., O’Gorman, M. T., Balic, A., Barr, T. A., Filbey, K., Anderton, S. M., Maizels, R. M. (2010). Helminth-induced CD19⁺CD23^{hi} B cells modulate experimental allergic and autoimmune inflammation. *European Journal of Immunology*, 40(6), 1682–1696.
- Wu, Z., Nagano, I., Asano, K., & Takahashi, Y. (2010). Infection of non-encapsulated species of *Trichinella* ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis involving suppression of Th17 and Th1 response. *Parasitology Research*, 107(5), 1173–1188.
- Zheng, X., Hu, X., Zhou, G., Lu, Z., Qiu, W., Bao, J., & Dai, Y. (2008). Soluble egg antigen from *Schistosoma japonicum* modulates the progression of chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis via Th2-shift response. *Journal of Neuroimmunology*, 194(1–2), 107–114.
- Zhu, B., Trikudanathan, S., Zozulya, A. L., Sandoval-Garcia, C., Kennedy, J. K., Atochina, O., Norberg, T., Castagner, B., Seeberger, P., Fabry, Z., Harn, D., Khoury, S. J., Guleria, I. (2012). Immune modulation by Lacto-N-fucopentaose III in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical Immunology*, 142(3), 351–361.
- Zhu, C., Anderson, A. C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S. J., Zheng, X. X., Strom, T. B., Kuchroo, V. K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature Immunology*, 6(12), 1245–1252.

Internetové zdroje:

Multiple Sclerosis International Federation. Atlas of MS 2013 [online]. Londýn, 2013, 28 s. [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2014/09/Atlas-of-MS.pdf>

NCT00645749: Helminth-induced Immunomodulation Therapy (HINT) in Relapsing-remitting Multiple Sclerosis (HINT). ClinicalTrials.gov [online]. National Institutes of Health, 2008 [cit. 2018-07-31]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00645749>

NCT01006941: Trichuris Suis Ova Therapy for Relapsing Multiple Sclerosis - a Safety Study (TRIMS A). ClinicalTrials.gov [online]. National Institutes of Health, 2009 [cit. 2018-08-07]. Dostupné z: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01006941>

NCT01413243: Trichuris Suis Ova (TSO)in Recurrent Remittent Multiple Sclerosis and Clinically Isolated Syndrome (TRIOMS). ClinicalTrials.gov [online]. National Institutes of Health, 2011 [cit. 2018-08-07]. Dostupné z: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01413243>

NCT01470521: Worms for Immune Regulation of Multiple Sclerosis (WIRMS). ClinicalTrials.gov [online]. National Institutes of Health, 2011 [cit. 2018-08-07]. Dostupné z: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01470521>

WHO. Schistosomiasis: What is schistosomiasis? *WHO* [online]. 2018 [cit. 2018-07-13]. Dostupné z: <http://www.who.int/schistosomiasis/disease/en>